Zur Chemie von ungewöhnlichen Mureinen bei coryneformen Bakterien

Brunhild Komor

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546016_0026

Zur Chemie von ungewöhnlichen Mureinen bei coryneformen Bakterien

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von Brunhild Komor, geb. Cziharz aus Saaz

Mai 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter Prof. Dr. O. Kandler

2. Berichterstatter Dr. K. H. Schleifer

Tag der mündlichen Prüfung 29. 6. 1972

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Material und Methoden	2
1.	Stämme	2
2.	Nährmedien	2
3.	Kulurbedingungen und Anzucht der Stämme	2
4.	Gewinnung von Zellwänden	3
	4.1 übliche Methode	3
	4.2 aus TES-extrahierten Zellen	4
5.	Hydrolysebedingungen	4
	5.1 Totalhydrolyse von Murein und Peptiden	4
	5.2 Totalhydrolyse von Mureinvorstufen	4
	5.3 Partialhydrolysen	5
	5.4 Zellwandpolysaccharide	5
6.	Qualitative Papier- und Dünnschichtchromatographie	5
	6.1 Aminosäuren, Aminozucker und Peptide	5
	6.11 Papierchromatographie	5
	6.12 Dünnschichtchromatographie	6
	6.2 DNP-Aminosäuren und DNP-Aminozucker	6
	6.3 Zucker	7
7.	Präparative Papier- und Dünnschichtchromatographie	7
	7.1 Isolierung von Peptiden aus Zellwandhydrolysaten	7
	7.2 DNP-Aminosäuren und -Peptide	8
	7.3 UDP-aktivierte Mureinvorstufen	9
8.	Hochspannungspapierelektrophorese	9
9.	Quantitative Bestimmung von Aminosäuren, Aminozuckern und Ammoniak	10
10.	Quantitative Bestimmung von Glucose	10
11.	Dinitrophenylierung	10
	11.1 Zellwände	10
	11.2 Peptide und freie Aminosäuren	11

Seite

12. Bestimmung des Gehalts an dinitrophenylierbaren Aminosäuren im Murein 11
13. Bestimmung der Konfiguration von Aminosäuren 12
13.1 Alanin 12
13.2 Glutaminsäure 12
13.3 Lysin und Ornithin 12
14. Hydrazinolyse 13
15. Bestimmung der freinen reduzierenden Gruppe von Glucosamin 13
15.1 Anilinhydrogenphtalat 13
15.2 Reduktion mit Natriumborhydrid 13
16. Prüfung auf α-Peptidbindung duch Photolyse 14
17. Gewinnung von UDP-aktivierten Mureinvorstufen 14
18. Bestimmung von Uridin 15
18.1 Qualitativ 15
18.2 Quantitativ 16
19. Morgan-Elson Test auf N-Acetylaminozucker 16
20. Bestimmung von Phosphat 16

III. Vorkommen eines UDP-N-Acetylmuramyl-Hexapeptids bei Brevibacterium incertum

a) Einleitung 17

b) Ergebnisse 19

1. Mureinzusammensetzung 19
1.1 Aminosäurezusammensetzung 19
1.2 Konfigurationsbestimmung von Aminosäuren 19
1.21 Alanin 19
1.22 Glutaminsäure 20
1.3 Partialhydrolysat 20
2. Mureinvorstufen 23
2.1 Aminosäurezusammensetzung 23

Seite

2.2 Strukturnachweis für das UDP-N-Acetylmuramyl-Hexapeptid 26
2.21 Nachweis des Uridins 26
2.22 Phosphatbestimmung 28
2.23 Struktur des Peptidanteils 28
2.3 Zusammenfassung 34

c) Diskussion 36

IV. Ein neuer Typ einer Peptiduntereinheit bei Arthrobacter Stamm J39

a) Einleitung 38

b) Ergebnisse 39

1. Aminosäurezusammensetzung des Mureins 39
1.1 Quantitative Aminosäurezusammensetzung 39
1.2 Identifizierung der Hydroxyglutaminsäure 39
1.3 Ammoniakgehalt 40
1.4 Konfigurationsbestimmung von Aminosäuren 40
1.5 C-terminale Aminosäuren 41
1.6 N-terminale Aminosäuren 41
2. Mureinvorstufen 42
2.1 Isolierung der Vorstufen 42
2.2 Aminosäurezusammensetzung 45
2.3 Konfiguration von Glutaminsäure und Alanin 46
2.4 Nachweis der UDP-aktivierten Vorstufe 46
2.41 Nachweis des Uridins 46
2.42 Phosphatbestimmung 47
2.43 Morgan-Elson Test 48
2.44 Peptidanteil 48
2.5 Partialhydrolysate der Vorstufen 49
3. Partialhydrolysat der Zellwand 53

c) Diskussion 54

Seite

V. Eine glucosaminhaltige Peptiduntereinheit im Murein von Arthrobacter Stamm J73

a) Einleitung 57

b) Ergebnisse 58

1. Mureinzusammensetzung 58
1.1 Aminosäurezusammensetzung 58
1.11 Qualitative Zusammensetzung 58
1.12 Quantitative Zusammensetzung 58
1.2 Strukturaufklärung der schwer hydrolysierbaren Verbindungen 60
1.21 Verbindung Y 60
1.22 Verbindung X 62
1.3 Qualitative Bestimmung der Zuckerzusammensetzung 64
1.4 Quantitative Bestimmung von Glucose 64
1.5 Konfigurationsbestimmung von Ornithin 64
1.6 Bestimmung von amidgebundenem Ammoniak 64
1.7 Dinitrophenylierte Zellwand 65
1.71 Chromatogramm des Totalhydrolysats der DNP-Zellwand 65
1.72 Dinitrophenylierte Verbindungen 66
1.8 Partialchromatogramm und Struktur des Mureins 70
1.9 Vorkommen der Verbindung Hser-GlcNH$_2$ im Murein anderer coryneformer Organismen 72
2. Mureinvorstufen 75
2.1 Isolierung der Vorstufen 75
2.2 Aminosäurezusammensetzung 75
2.3 Dinitrophenylierte Vorstufe 75
2.31 Aminosäurezusammensetzung der DNP-vorstufe 77
2.32 Dünnschichtchromatogramm des hydrolysierten DNP-Derivats 77
2.33 Abspaltung des DNP-Rests mit Hydrazin 78
2.4 Struktur der Mureinvorstufe 79

c) Diskussion 80

VI. Zusammenfassung 82

Literaturverzeichnis 84

Zur Chemie von ungewöhnlichen Mureinen bei coryneformen Bakterien

Die Untersuchung der Mureine einer großen Zahl gram-positiver Bakterien hat gezeigt,daß die Variation im Aufbau des Mureins größer ist,als man anfangs angenommen hatte (Schleifer 1970).Innerhalb dieser Variation zeigten sich aber gewisse Regelmäßigkeiten.Eine davon ist,daß in Position 3 des Tetrapeptids immer eine Diaminosäure steht,mit einer einzigen Ausnahme,nämlich wenn sie durch Homoserin ersetzt ist.Als eine andere Regel erwies sich,daß am Peptidanteil des Mureins keine anderen Zellwandbestandteile gebunden sind,abgesehen von Escherichia coli,bei dem die Carboxylgruppe der Diaminopimelinsäure mit einem Protein substiuiert ist (Braun und Wolff 1970).

In der folgenden Arbeit werden zwei Mureine beschrieben, die diese Regeln durchbrechen.In dem einen Fall ist die Diaminosäure durch L-Glutaminsäure ersetzt,in dem andern ist an die Peptiduntereinheit ein Aminozucker gebunden.

Außerdem wurde eine Ausnahme in der Synthese der Mureinvorstufen gefunden.Sie besteht darin,daß die Interpeptidbrücke schon auf die UDP-aktivierte Vorstufe und nicht erst auf die lipidgebundene Form der Vorstufe übertragen wird.

II. Material und Methoden

1. Stämme

Die Stämme J39 und J73 wurden uns von Dr. Keddie, Department of Microbiology, The University, Reading, England, in Form von gefriergetrockneten Kulturen zur Verfügung gestellt. Brevibacterium incertum erhielten wir von der American Type Culture Collection als gefriergetrocknete Kultur unter der Nummer 8363.

2. Nährmedien

2.1 Nährmedien der Stämme J39 und J73

Hefe-Dextrose-Bouillon (Schleifer et al. 1967a) mit Kochsalzzusatz:

5g Hefeextrakt (Cenovis)
10g tryptisch verdautes Pepton aus Casein (Merck)
5g D-Glucose
1l Leitungswasser
pH vor dem autoklavieren 7,4 - 7,6

2.2 Nährmedium für Brevibacterium incertum

wie unter 2.1 mit dem Unterschied, daß 3g Hefeextrakt durch 3g Fleischextrakt ersetzt wurden.

3. Kulturbedingungen und Anzucht der Stämme

Die Stämme J39 und J73 wurden aerob bei 28-30°C bebrütet. Br. incertum wurde in flüssiger Kultur in Steilbrustfla-

schen ohne Belüftung, ebenfalls bei 28-30°C inkubiert. Die Stämme wurden auf Schrägröhrchen bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt und im Abstand von 4-6 Wochen überimpft.
Zur Anzucht von Massenkulturen der beiden Keddie-Stämme für die Zellwandaufarbeitung wurden 2-3 3l-Erlenmeyerkolben, die jeweils 1l Nährlösung enthielten, mit je 5ml dichtgewachsener Vorkultur beimpft und bis zur späten logarithmischen Wachstumsphase bebrütet.
Für die Gewinnung von Mureinvorstufen wurde zum Beimpfen von 1l Bouillon 100ml über Nacht gewachsene Vorkultur zugegeben.
Zur Gewinnung von Massenkulturen von Br.incertum für Zellwand- und Vorstufenaufarbeitung wurden 20l-Steilbrustflaschen, die 18l Nährbouillon enthielten, mit je 2l Vorkultur beimpft und 2 Tage bei 28°C bebrütet. Geerntet wurde ein Ansatz von dieser Menge mit Hilfe einer Durchlaufzentrifuge unter Eiskühlung.
Bei der Ernte der Massenkulturen wurden die Organismen im Phasenkontrastmikroskop und durch Anlegen eines Verdünnungsausstrichs aus jedem Kolben auf Reinheit überprüft.

4. Gewinnung von Zellwänden

4.1 Herkömmliche Methode (Schleifer und Kandler 1967)

Die in Massenkultur gezogenen Organismen werden zur Inaktivierung autolytischer Enzyme 30min. im Dampftopf erhitzt und abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden mit Glasperlen (0,17-0,18mmØ) zu einem dickflüssigem Brei vermischt und in einem Homogenisator der Fa. Bühler, Tübingen, in der Regel 20-25min. zerschlagen, im Prinzip so lange, bis im Phasenkontrastmikroskop keine ganzen Zellen mehr zu sehen waren. Die aufgebrochenen Zellen wurden dann durch eine Schott-G-1 Fritte von den

Glasperlen abgesaugt und 25min. bei 15 000g abzentrifugiert. Das Sediment wurde zur Reinigung von Protein mit Trypsin (Merck, 0,5mg/ml) in 0,05M Phosphatpuffer pH 7,8 bei 37°C 8-24 Std. inkubiert, unter Zusatz von einigen ml Toluol gegen Bakterien- und Hefenwachstum.
Die Zellwände wurden dann mikroskopisch auf Infektionen geprüft, abzentrifugiert, 4-5mal mit Wasser gewaschen und gefriergetrocknet.

4.2 Zellwandgewinnung aus TES-extrahierten Zellen

Die für die Gewinnung von Mureinvorstufen mit TES extrahierten Zellen (Paragr.17) wurden zur Entfernung der TES 3-4mal mit Wasser gewaschen, mit Glasperlen vermischt und wie unter 4.1 weiter behandelt. Die so erhaltenen Zellwände erwiesen sich als noch sehr verunreinigt mit Cytoplasmaprotein, daß es notwendig war, sie ein zweites Mal zu zerschlagen und mit Trypsin zu behandeln. Diese Schwierigkeit bei der Reinigung ist wahrscheinlich auf die sehr zähe Konsistenz der extrahierten Zellmasse zurückzuführen, die weder mit den Glasperlen, noch im Puffer bei der Trypsinverdauung eine homogene Suspension zuläßt.

5. Hydrolysenbedingungen

5.1 Totalhydrolyse von Murein und Peptiden

Zur Bestimmung des Gehalts an Aminosäuren und Aminozuckern wurden Zellwände und Peptide im Einschlußrohr in 4N HCl 16Std. bei 100°C hydrolysiert (Schleifer und Kandler 1967). Besonders beständige Verbindungen wurden in leichter Abwandlung der Bedingungen bei Swallow und Abraham 1958 in 6N HCl 16Std. bei 120°C hydrolysiert.

5.2 Totalhydrolyse von Mureinvorstufen

Mureinvorstufen wurden zum Teil hydrolysiert wie Zell-

wände unter 5.1, in der Regel aber in 5N HCl 5Std. bei 100°C.

5.3 Partialhydrolysen

Partialhydrolysen zur Spaltung von Murein und Vorstufen in kleinere Bruchstücke wurden im Einschlußrohr in 4N HCl bei 100°C mit unterschiedlichen Hydrolysezeiten hergestellt. Bei Zellwänden betrug die Zeit in der Regel 45min., bei Mureinvorstufen 5-10min. Für die Isolierung eines bestimmten Peptides wurde zur Ermittlung der günstigsten Hydrolysedauer eine Hydrolysenkinetik aufgestellt.
Nach erfolgter Hydrolyse wurden die Einschlußrohre aufgebrochen, die Totalhydrolysate in einem Wasserbad bei 60°, die Partialhydrolysate bei 30°C gehalten, und die Salzsäure mit einem Luftstrom abgeblasen.

5.4 Zellwandpolysaccharide

Zur Bestimmung der Zucker aus dem Polysaccharid wurde die Zellwand im Einschlußrohr in 2N HCl 2Std. bei 100°C hydrolysiert.

6. Qualitative Papier- und Dünnschichtchromatographie

6.1 Aminosäuren, Aminozucker und Peptide

6.11 Papierchromatographie

Aminosäuren, Aminozucker nnd Peptide wurden auf Chromatographiepapier Schleicher & Schüll 2043b gew. 1-oder 2--dimensional, absteigend aufgetrennt. Es wurden folgende Laufmittel verwendet:

I Isopropanol / Wasser / Eisessig = 75/10/15 (V/V)
II α-Picolin / Wasser / Ammoniak = 70/28/ 2 (V/V)

Zum Nachweis der Aminogruppen wurde Ninhydrin-Sprühreagenz verwendet:

5g Ninhydrin (Merck)
930 ml Butanol, wassergesättigt
70 ml Eisessig

Nach dem Sprühen wurden die Chromatogramme bei 100°C entwickelt. Dabei erscheinen Peptide mit N-terminalem Glycin gelb, bevor sie in den üblichen blauvioletten Farbton umschlagen. Hydroxyglutaminsäure färbt sich blau. Aminozucker, Aminosäuren und ein Teil der Peptide, die in unserem Arbeitskreis bereits analysiert worden sind, wurden lediglich nach ihren R_{ala}- Werten in den verschiedenen Lösungsmittelsystemen identifiziert.

6.12 Dünnschichtchromatographie

Es wurden zum Teil Zellulosefertigplatten der Fa.Merck verwendet, zum Teil wurden Glasplatten mit Zellulose MN3000 (Machery & Nagel, Düren) in 0,25mm Dicke beschichtet unter Verwendung eines Streichgeräts der Fa.Shandon. Chromatographiert wurde aufsteigend 1-dimensional in folgendem Laufmittel:

III Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser = 65/25/13/8(V/V)

Nachweis der Aminogruppen und Entwicklung des Chromatogramms erfolgten wie unter 6.11.

6.2 DNP-Aminosäuren und DNP-Aminozucker

DNP-Derivate von Aminosäuren und Aminozuckern wurden für qualitative Zwecke dünnschichtchromatographisch aufgetrennt im 1-dimensional aufsteigenden Verfahren. Es wurden Zelluloseplatten (siehe 6.12) verwendet, oder Kieselgelplatten, die mit Kieselgel G (Merck) wie unter 6.12 hergestellt worden waren.

Folgende Laufmittel wurden verwendet:

Laufmittel III (6.12)

IV 1,5M Phosphatpuffer pH 6,0 (Levy 1954)
V Benzol / Eisessig = 8 / 2 (V/V)
VI n-Propanol / wässr. Ammoniaklösung 0,2%ig = 85/15 (V/V)

Als Vergleichssubstanzen wurden DNP-Aminosäuren der Fa. Serva, Entwicklungslabor, Heidelberg, kochromatographiert, sowie die selbst hergestellten DNP-Derivate von 3-Hydroxyglutaminsäure und Glucosamin.

6.3 Zucker

Zucker aus Hydrolysaten des Zellwandpolysaccharids wurden auf Whatman Chromatographiepapier Nr.1 2-dimensional absteigend aufgetrennt. Dazu wurden folgende Laufmittel verwendet:

VII Phenol 88% / Wasser / Eisessig / 1M Na_2EDTA = 840 / 160 / 10 / 1 (V/V)
VIII Butanol / Pyridin / Wasser / Eisessig = 60 / 40 / 30 / 3 (V/V)

Nachweisreagenz war Silbernitrat (Trevelyan et al. 1950). Zur Identifizierung der Zucker auf den 2-dimensionalen Chromatogrammen wurden die im Arbeitskreis bekannten $R_{Glucose}$- Werte verglichen.

7. Präparative Papier- und Dünnschichtchromatographie

7.1 Isolierung von Peptiden aus Zellwandhydrolysaten

Es wurden 2 verschiedene Methoden angewendet.

a) Methode zur Isolierung von Peptiden, die in relativ großer Menge im Partialhydrolysat vorhanden sind:

Das Partialhydrolysat wurde strichförmig auf das Chromatogramm aufgetragen und wiederholt 1-dimensional in einem Laufmittel entwickelt. Die Ränder des aufgetrennten Hydrolysats und die kochromatographierten Standards wurden

zur Lokalisierung mit Ninhydrinreagenz besprüht. Der Streifen, der das gesuchte Peptid enthielt, wurde ausgeschnitten, eluiert, und in gleicher Weise wie das erstemal in einem anderen Lösungsmittel chromatographiert. Verschiedentlich wurde dann noch einmal im ersten Laufmittel chromatographiert, wo jetzt wegen der geringen Menge an Begleitsubstanzen ein besserer Trenneffekt erzielt wurde.

b) Methode zur Isolierung von Peptiden relativ geringer Menge

Es wurden mehrere 2-dimensionale Parallelchromatogramme des Partialhydrolysats angefertigt. Eines wurde als Vorlage mit Ninhydrin besprüht. Bei den übrigen Chromatogrammen wurden Aminosäuren und nicht benötigte Peptide besprüht, um damit die gesuchten Peptide genauer lokalisieren zu können. Diese wurden auf Verdacht ausgeschnitten und eluiert. Der Rest des Chromatogramms wurde zur Kontrolle ganz mit Ninhydrin besprüht. Nach diesem Verfahren war es in vielen Fällen nötig, die gewonnenen Peptide noch einmal 1-dimensional papierchromatographisch zu reinigen.

7.2 DNP-Aminosäuren und -Peptide

DNP-Aminosäuren, die in größeren Mengen vorlagen, wurden papierchromatographisch 1-dimensional in Laufmittel IV oder VI aufgetrennt und mit Wasser eluiert. DNP-Peptide, die in geringeren Mengen anfielen, wurden dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel in Laufmittel III oder IV aufgetrennt. Das Kieselgel wurde an der Stelle des DNP-Peptids ausgekratzt, wiederholt mit Methanol extrahiert und abzentrifugiert.

7.3 UDP-aktivierte Mureinvorstufen

Die auf der Sephadexsäule vorgereinigten Vorstufen (17) wurden auf Chromatographiepapier Whatman Nr.3MM 1-dimensional absteigend in folgenden Laufmitteln aufgetrennt:
VII Isobuttersäure / konz.Ammoniak / Wasser =
100 / 4 / 55 (V/V)
VIII Äthanol / 1M NH_4Ac (pH 7-7,5) = 7,5 / 3 (V/V)
(beide Laufmittel Plapp und Strominger 1970b).

Die Vorstufen wurden in der Regel zuerst im Isobuttersäure Laufmittel 3mal 20Std. chromatographiert. Als Marker wurde ATP kochromatographiert, das hier etwa auf die Höhe eines UDP-Muramylpentapeptids läuft. Die Vorstufen sind infolge der Absorption des Nukleotids bei 260nm unter einer UV-Lampe mit einheitlicher Strahlung von 254nm als dunkle Flecke sichtbar. Wegen der Eigenabsorption der Isobuttersäure mußten die Chromatogramme vor der Auswertung 2-4 Tage zur Entfernung von Laufmittelresten getrocknet werden. Die UV-absorbierenden Banden wurden ausgeschnitten, mit dest. Wasser eluiert und meist zur weiteren Reinigung in Laufmittel VIII mit UMP als Marker 2mal 15Std. chromatographiert.

8. Hochspannungselektrophorese

Zur Trennung von Glutaminsäure- und Hydroxyglutaminsäure-enthaltenden Peptiden wurde Hochspannungselektrophorese auf Whatman Chromatographiepapier Nr.3MM unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 58V/cm, 2-4 Std., Puffersystem Ameisensäure/Essigsäure/Wasser = 5/15/80 (V/V), pH 1,9 (Schleifer et al. 1967a).

9. Quantitative Bestimmung von Aminosäuren, Aminozuckern und Ammoniak

Die quantitative Bestimmung von Aminosäuren, Aminozuckern und Ammoniak erfolgte auf einem Aminosäureanalysator der Fa. Beckman. Bei jeder neuen Charge Ninhydrin wurden routinemäßig die Konstanten von Aminosäuren und Aminozuckern für die Hydrolysebedingungen 4N HCl, 16Std., 100°C bestimmt. Die Werte der UDP-Vorstufen, die 5Std. in 5N HCl hydrolysiert worden waren, wurden mit diesen Konstanten berechnet. Für Zellwände und Peptide, die in 6N HCl, 16Std. bei 120°C hydrolysiert werden mußten, oder zusätzlich mit Ammoniak behandelt wurden, wurden authentische Aminosäuren und Aminozucker den gleichen Bedingungen unterworfen, und aus den Analysatorläufen die Konstanten ermittelt. Diese Konstanten stammen nun aber nicht aus derselben Charge Ninhydrin wie die damit berechneten Proben; es muß also ein größerer Fehler berücksichtigt werden.

10. Quantitative Bestimmung von Glucose

Glucose wurde mit Hilfe eines abgewandelten Blutzuckertests der Fa.Boehringer bestimmt.

11. Dinitrophenylierung

11.1 Zellwände

Zellwände wurden nach der von Schleifer und Kandler 1967 beschriebenen Methode in der Abwandlung von Fiedler 1971 dinitrophenyliert:
20-30mg Zellwände wurden in 10ml Wasser und 5ml 1%iger $NaHCO_3$-Lösung suspendiert, mit 30ml 1%iger alkoholischer 1-Fluor-2,4-Dinitrobenzollösung (Merck) versetzt und 6 Std. bei 37°C im Dunkeln geschüttelt. Die dinitropheny-

lierten Zellwände wurden abzentrifugiert, zur Entfernung von überschüssigem FDNB mit Äther gewaschen, dann mit 96%igem und 50%igem Alkohol, zuletzt mit Wasser. Darauf wurden sie gefriergetrocknet.

11.2 Peptide und freie Aminosäuren

Die Dinitrophenylierung von Peptiden und freien Aminosäuren erfolgte nach der Vorschrift von Primosigh et al. 1961 in der Abwandlung von Fiedler 1971:
Das Peptid wurde in einigen Tropfen 1%iger $NaHCO_3$-Lösung aufgenommen und mit 1%iger alkoholischer FDNB-Lösung versetzt, bis die Lösung klar wurde. Dann wurde 30min. bei 58°C inkubiert. Nach der Dinitrophenylierung wurde die Lösung bis zur Trockenheit eingeblasen, der Rückstand in 0,5ml Wasser aufgenommen und mit Äther 3-4mal ausgeschüttelt. Dann wurde mit Salzsäure angesäuert und das dinitrophenylierte Peptid mit Äthylacetat mehrmals extrahiert.

12. Bestimmung des Gehalts an dinitrophenylierbaren Aminosäuren im Murein

Die Bestimmung der dinitrophenylierbaren Aminosäuren erfolgte nach 2 Methoden:
a) Indirektes Verfahren:
Vergleich des Aminosäuregehalts von dinitrophenylierter und nicht dinitrophenylierter Zellwand.
b) Direktes Verfahren:
Dafür wurden die DNP-Aminosäuren aus dem Totalhydrolysat der Zellwand chromatographisch aufgetrennt, eluiert, und ihre Extinktion in 1%iger $NaHCO_3$-Lösung bei 360nm gemessen. Zur Berechnung der Menge wurden die von Salton 1961 ermittelten molaren Extinktionskoeffizienten herangezogen.

13. Bestimmung der Konfiguration von Aminosäuren

13.1 Alanin

a) L-Alanin wurde enzymatisch nach der Methode von Pfleiderer (Bergmeyer 1962) bestimmt, bei der L-Alanin zusammen mit α-Ketoglutarat mit Hilfe von Glutamat-Pyruvat-Transaminase in Pyruvat übergeführt wird, und dieses durch Lactatdehydrogenase in Gegenwart von NADH hydriert wird. Die Reaktion wurde durch Messung der Extinktionsabnahme des NADH bei 366nm verfolgt.

b) D-Alanin wurde ebenfalls enzymatisch nach Schleifer und Kandler 1967 bestimmt. D-Alanin wurde mit D-Aminosäureoxidase in Pyruvat überführt, dieses wieder mit Lactatdehydrogenase und NADH in Lactat. Gemessen wurde wieder die Abnahme an NADH.

Die Bestimmungen wurden an filtrierten und neutralisierten Totalhydrolysaten vorgenommen.
(Alla Enzyme: Fa. Boehringer, Tutzing)

13.2 Glutaminsäure

Die L-Glutaminsäurebestimmung wurde enzymatisch nach Bernt und Bergmeyer (Bergmeyer 1962) durchgeführt. L-Glutamat wurde dabei durch Glutamatdehydrogenase in Gegenwart von NAD in α-Ketoglutarat überführt. Die Zunahme der NADH-Extimktion wurde bei 366nm gemessen.
(Glutamatdehydrogenase der Fa. Boehringer, Tutzing).

13.3 Lysin und Ornithin

Die Konfiguration von Lysin und Ornithin wurde mit Hilfe der optischen Rotationsdispersion festgestellt(Bricas et al. 1967). Dazu wurde das bis-DNP-Derivat der Zell-

wandaminosäure hergestellt und in so viel Eisessig aufgenommen, daß die Extinktion bei 418nm 1 betrug. Dann wurde die optische Rotationsdispersion zwischen 400 und 500nm gemessen. Der bei 418nm auftretende Cotton-Effekt ermöglicht eine Bestimmung der Konfiguration.

14. Hydrazinolyse

Hydrazinolyse des Mureins zur Bestimmung der C-terminalen Aminosäuren wurde nach der ausführlichen Beschreibung von Fiedler 1971 durchgeführt, in Kombination der Methoden von Braunitzer 1955, Niu und Fraenkel-Conrat 1955 und Braun und Schroeder 1967.

15. Bestimmung der freien reduzierenden Gruppe von Glucosamin

15.1 Anilinhydrogenphtalat

Das Sprühreagenz (Partridge 1949) ergibt mit Aminozuckern bei freier reduzierender Gruppe einen gelben bis braunen Farbkomplex.

15.2 Reduktion mit $NaBH_4$

Die Reduktion der freien reduzierenden Gruppe von Glucosamin mit $NaBH_4$ wurde nach der Beschreibung von Leyh-Bouille et al. 1966 durchgeführt:
30µl mit o,1 - 0,4µMol Zucker wurden mit 3µl frischer 1M $NaBH_4$-Lösung versetzt und 4Std. bei Zimmertemperatur inkubiert. Dann wurden 6µl 1N Essigsäure zugegeben, um die Reaktion zu stoppen, und die Probe gefriergetrocknet. Zur Entfernung der Borsäure wurde mehrmals Methanol zugegeben und abgeblasen. Die Bestimmung des Aminozuckers und des Aminozuckeralkohols erfolgte am Aminosäure-

analysator.

16. Prüfung auf α-Peptidbindung durch Photolyse des dinitrophenylierten Peptids

Nach der Methode von Perkins 1967 wurde das dinitrophenylierte Peptid in einer Lösung von 1%igem $NaHCO_3$ in einer Quartzküvette 15min. von einer Quecksilberlampe bestrahlt. α-DNP-Aminosäuren spalten im UV-Licht 4-Nitro,2-Nitrosoanilin und CO_2 ab, und ein Aldehyd bleibt übrig. Die Reaktion ist feststellbar an der Abnahme der Extinktion bei 348nm (DNP-Rest) und dem Anstieg der Extinktion bei 284nm (4-Nitro,2-Nitrosoanilin). Bei Peptiden mit gebundener α-Carboxylgruppe kann diese Reaktion nicht stattfinden.

17. Gewinnung von UDP-aktivierten Mureinvorstufen

Über Nacht gewachsene Kulturen wurden in neuem Medium 1:10 verdünnt und je nach Stamm mit oder ohne Belüftung bei 28-30°C inkubiert, bis sie eine optische Dichte von 1 bei 578nm erreicht hatten (gemessen in einem Eppendorf-Photometer gegen eine Nullküvette mit sterilem Medium).Zur Anreicherung von UDP-Muramyltripeptid wurde D-Cycloserin (Deutsche Hoffmann-LaRoche AG, Grenzach) zugegeben (Roze and Strominger 1966; Neuhaus and Lynch 1964). Zur Anreicherung von UDP-Muramylpentapeptid wurde Vancomycin (Ely Lilly and Co. Ltd., Basingstoke, Hantshire, England) zugesetzt (Reynolds 1961). Daraufhin wurde weitere 1,5Std. inkubiert. Zur Gewinnung der Vorstufen ohne künstliche Anreicherung wurden die Kulturen bis zur späten logarithmischen Phase bebrütet.
Die Zellen wurden dann abzentrifugiert, mit etwa 4 Volumina kalter, 25%iger (G/V) TES* versetzt und 40min. bei

* TES = Trichloressigsäure

4°C extrahiert (Chatterjee and Perkins 1966). Unlösliches Material wurde abzentrifugiert. Der Überstand wurde zur Entfernung der TES 4-5mal mit Äther extrahiert bis auf einen pH zwischen 3 und 4, und anschließend mit verdünntem Ammoniak neutralisiert. Die Lösung wurde bei Zimmertemperatur am Rotationsverdampfer auf etwa 5ml eingeengt und mit einem gleichen Volumen 96%igem Alkohol versetzt (Perkins 1971). Die dadurch ausgefällten Polysaccharide wurden abzentrifugiert, der Überstand auf eine Säule (80 x 2,5cm) mit Sephadex G25 fine aufgetragen (Rosenthal and Sharon 1964), um die UDP-Vorstufen von Nukleotiden und Peptiden abzutrennen. Eluiert wurde mit 0,01N Essigsäure oder dest. Wasser mit einer Laufgeschwindigkeit von 4-6 Tropfen/min., beziehungsweise 190ml/Std. Mit Hilfe eines "Uvicord" Photometers mit angeschlossenem Schreiber und einem Fraktionskollektor (alles LKB, Schweden) wurde das Eluat im Durchfluß auf seine Extinktion bei 260 nm gemessen und in Fraktionen zu 99 Tropfen gesammelt. Von den Fraktionen wurden in Stichproben je o,5ml entnommen und auf gebundenen N-Acetylaminozucker geprüft. Fraktionen, die bei 260nm absorbierten und gebundenen N-Acetylaminozucker enthielten wurden vereinigt, bis zur Trockenheit eingeengt, und die enthaltenen Mureinvorstufen wie unter 7.3 angegeben papierchromatographisch aufgetrennt.

18. Bestimmung von Uridin

18.1 Qualitative Bestimmung

Uridin und seine Derivate wurden durch Aufnahme des Spektrums zwischen 220 und 290nm bestimmt, das bei pH 2-7 bei 262nm ein Maximum und bei 230nm ein Minimum

aufweist. Quotienten, gebildet bei bestimmten pH aus den Extinktionen bei verschiedenen Wellenlängen, stellen für die Nukleotide der einzelnen Basen charakteristische Werte dar. Für Uridin gilt bei pH 2-7:

$$\frac{\Delta E\ 250}{\Delta E\ 260} = 0{,}73 \qquad \frac{\Delta E\ 280}{\Delta E\ 260} = 0{,}39$$

(Biochemisches Taschenbuch I, S. 859)
Die Extinktionsmessungen wurden zwischen pH 2 und 7 in 0,01N Essigsäure oder dest. Wasser ausgeführt. Als Vergleich diente ein Standard von Uridinmonophosphat im gleichen Lösungsmittel.

18.2 Quantitative Bestimmung

Quantitativ wurde das Uridinnukleotid durch Messung der Extinktion im Absorptionsmaximum bei 262nm durchgeführt. Die Messung erfolgte zu den gleichen Bedingungen wie unter 18.1. Die Berechnung erfolgte unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten für Uridinmonophosphat (Biochemisches Taschenbuch I) und durch Vergleich mit einer Standardlösung von Uridinmonophosphat.

19. Morgan-Elson Test auf N-Acetylaminozucker

Der Morgan-Elson Test auf N-Acetylaminozucker (Aminoff et al. 1952) wurde in der Bearbeitung von Reissig et al. 1955 durchgeführt. Dazu wurde vorher das Uridindiphosphat mit 0,01N HCl 15min. im kochenden Wasserbad abhydrolysiert. Zur annähernden Berechnung der Menge an N-Acetylmuraminsäure diente eine Eichkurve von N-Acetylglucosamin.

20. Bestimmung von Phosphat

Die Phosphatbestimmung wurde durchgeführt nach der Vorschrift von Chen et al. 1956.

III. Vorkommen eines UDP-N-Acetylmuramyl-Hexapeptids bei Brevibacterium incertum

a) Einleitung

Aus früheren Untersuchungen war bekannt,daß das Murein von Brevibacterium incertum zwei Mol Glutaminsäure pro Peptiduntereinheit enthält (Cziharz 1969).Mureine mit erhöhtem Glutaminsäuregehalt,die also neben der normal vorkommenden D-Glutaminsäure in Position 2 des Tetrapeptids zusätzliche Glutaminsäure aufweisen,sind schon bei verschiedenen gram-positiven Organismen gefunden worden. Die überschüssige Glutaminsäure kann dann in der Interpeptidbrücke lokalisiert sein,wie bei den Planokokken (Schleifer und Kandler 1970) oder einigen Mikrokokken- und Arthrobacterstämmen (Niebler et al.1969 ;Bogdanovsky et al.1971),oder sie ist neben der D-Glutaminsäure in Position 2 ein Teil des Tetrapeptids (Teil IV dieser Arbeit).Um zu klären,wie es im Fall von Brevibacterium incertum ist,wurde das Murein des Stamms näher untersucht und die Mureinvorstufen isoliert.Dabei wurde ein UDP-N-Acetylmuramyl-Hexapeptid gefunden.Ein UDP-aktiviertes Muramylhexapeptid wurde in der Literatur erst einmal beschrieben,nämlich von Mandelstam et al.1962,der es aus Streptococcus faecalis nach Behandlung mit Penicillin isolierte.Es handelte sich um ein UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid,beidem an die ε-Aminogruppe des Lysins ein L-Alanin gebunden war.Die Zellwand des Stammes war zu jener Zeit nicht bekannt,sodaß der Befund damals nicht in einen größeren Zusammenhang gestellt werden konnte. Neuere Untersuchungen haben aber gezeigt,daß bei verschiedenen Stämmen von S. faecalis Interpeptidbrücken, bestehend aus 2-3 Molen L-Alanin,vorkommen (Schleifer und Kandler 1967).Nachdem nunmehr bekannt ist,daß die

Zellwand von S.faecalis 2-3 Mol Alanin enthält,kann das von Mandelstam et al. isolierte UDP-aktivierte Muramyl-hexapeptid als Mureinvorstufe aufgefaßt werden,die bereits das erste Glied der Interpeptidbrücke trägt.
Ein weiterer Hinweis auf das Vorkommen eines UDP-N-Acetyl-muramyl-Hexapeptids ist ein kurzer Bericht von McCluer et al. aus dem Jahr 1955.Sie hatten ein Uridinnukleotid aus Streptococcus haemolyticus isoliert,das 4 Mole Alanin pro Nukleotid enthielt.Die Verbindung wurde allerdings nicht weiter untersucht.
Weil trotz zahlreicher Veröffentlichungen auf dem Gebiet der Mureinbiosynthese seit der Arbeit von Mandelstam et al.1962 nichts mehr von einem UDP-aktivierten Muramyl-hexapeptid bekannt geworden ist,wurde die aus Brevibacterium incertum isolierte Verbindung besonders gründlich untersucht.Es sollte geklärt werden,ob es sich der Struktur nach um eine Mureinvorstufe handeln könnte.

b) Ergebnisse

1. Mureinzusammensetzung

Wegen des schwachen Wachstums des Organismus wurden die Zellwände zusammen mit den Vorstufen aus einem Großansatz gewonnen:insgesamt 70 l Nährbouillon wurden nach der Beimpfung 2 Tage bei 28°C bebrütet und dann mit einer Durchlaufzentrifuge unter Zugabe von Eisstücken abzentrifugiert.Aus dem Sediment wurde nach der Extraktion der UDP-aktivierten Mureinvorstufen mit TES die Zellwand isoliert.Die Zellen wurden dabei zur besseren Reinigung zweimal zerschlagen und tryptisch verdaut.

1.1 Aminosäurezusammensetzung

Nach Totalhydrolyse der Zellwand in 4N HCl,16 Std. bei 100°C,ergab sich folgende Aminosäurezusammensetzung (Tab.1)

Tab.1:Aminosäurezusammensetzung im Totalhydrolysat des Mureins von Br.incertum.

	Mur	Glu	Ala	Lys	$GlcNH_2$	NH_3
uMol/mg ZW	0,243	0,711	0,759	0,423	0,405	0,162
Molverh.	0,57	1,68	1,8	1	0,96	0,4

1.2 Konfigarationsbestimmung von Aminosäurem

121 Alanin

Bei 0,759 µMol Gesamtalanin/mg Zellwand ergaben sich 0,270 µMol D-Alanin/mg Zellwand und 0,485 µMol L-Alanin/mg Zellwand.Daraus folgt ein Molverhältnis von D-Alanin

zu L-Alanin von 0,56:1

1.22 Glutaminsäure

Von 0,711 µMol Gesamtglutaminsäure/mg Zellwand wurden etwa 10% L-Glutaminsäure gefunden.Diese Menge lag bereits im untersten Bereich der Eichkurve des Tests.In Anbetracht der immer noch etwas durch Proteinaminosäuren verunreinigten Zellwandcharge kann man annehmen,daß das Murein nur D-Glutaminsäure enthält.

1.3 Partialhydrolysat

Die Peptide auf dem Chromatogramm des 45 min.Partialhydrolysats konnten bereits ohne nähere Analyse aus den Erfahrungen des Arbeitskreises identifiziert werden. Abbildung 1 zeigt das Schema eines 2-dimensionalen Papierchromatogramms.Es handelt sich um das gleiche Muster an Peptiden,wie es aus Partialhydrolysaten von Planokokkenzellwänden erhalten wird (Schleifer und Kandler 1970).
Die damals identifizierten Peptide Mur - L-Ala - D-Glu (8), L-Ala - D-Glu (6),γ- D-Glu - L-Lys (11) und L-Lys - - D-Ala (13) weisen auf eine normale Peptidunterein-heit Muramyl - L-Alanyl -γ- D-Glutamyl - L-Lysyl - - D-Alanin hin.Die α-Carboxylgruppe der Glutaminsäure scheint in Analogie zum Mureintyp der Planokokken nicht amidiert zu sein,da im Totalhydrolysat die Menge an Ammoniak weit unter 1 Mol pro Mol Lysin liegt.
Die übrigen Peptide N^6-γ- D-Glu - L-Lys (12),L-Lys - - D-Ala - D-Glu (10) und D-Ala - D-Glu (7) lassen darauf schließen,daß das zweite Mol Glutaminsäure die Quervernetzung zwischen der ε-Aminogruppe des Lysins und der Carboxylgruppe eines benachbarten D-Alanins herstellt.

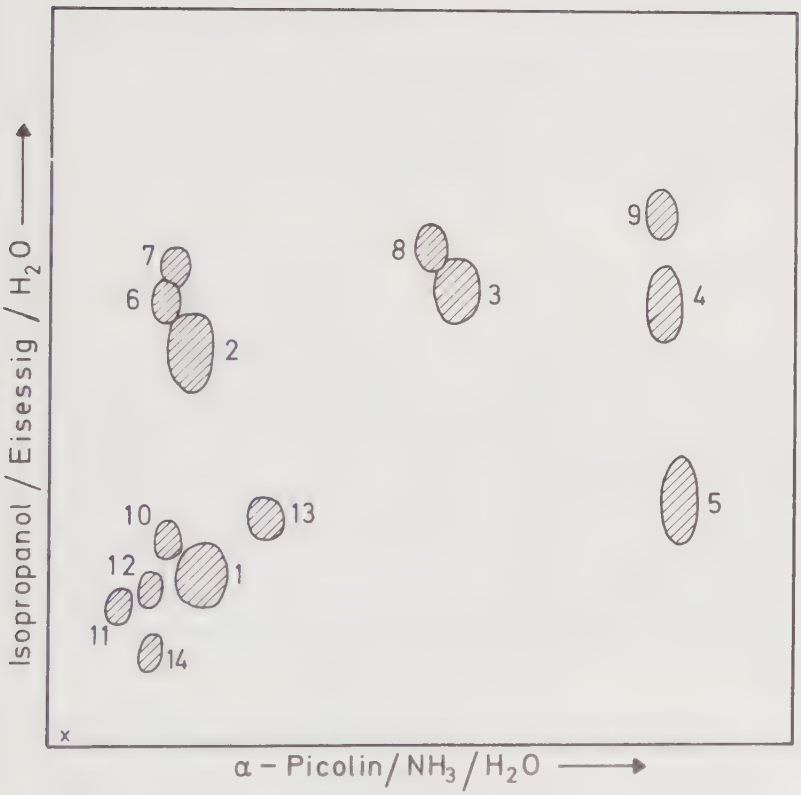


Abb.1:Papierchromatogramm eines 45min.Partialhydrolysats der Zellwand von Brevibacterium incertum.

1=Lysin;2=Glutaminsäure;3=Alanin;4=Muraminsäure;5= Glukosamin;6= L-Ala - D-Glu ;7= D-Ala - D-Glu ;8= Mur- - L-Ala D-Glu ;9= Mur - L-Ala;10= L-Lys - D-Ala - D-Glu; 11=γ- D-Glu - L-Lys ;12= N^6 -γ- D-Glu - L-Lys;13= L-Lys - D-Ala ;14=unbestimmt.

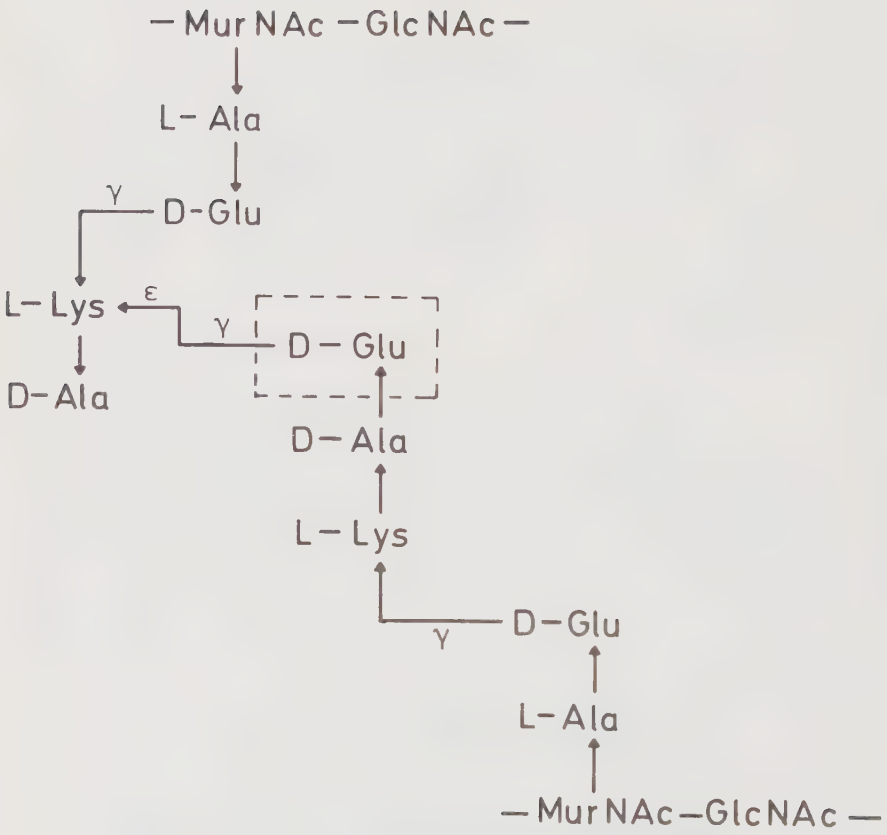


Abb.2:Ausschnitt aus der Primärstruktur des Mureins von Brevibacterium incertum.

Aus der quantitativen Aminosäurezusammensetzung, der Konfiguration der beiden Mole Glutaminsäure und dem Chromatogramm des Partialhydrolysats ist zu schließen, daß es sich bei Brevibacterium incertum um den gleichen Zellwandtyp handelt, der bei Planokokken gefunden wurde. Abbildung 2 zeigt einen Ausschnitt aus dem Murein dieses Typs.

2. Mureinvorstufen

Die Mureinvorstufen wurden aus der 70 l Massenkultur wie unter II.17 beschrieben isoliert. Nach der zweitägigen Bebrütung war ein Teil der Zellmasse bereits ausgeflockt, obwohl die Nährlösung erst schwache Trübung zeigte. Die Organismen befanden sich sehr wahrscheinlich schon in der stationären Wachstumsphase. Der Zellextrakt wurde geteilt und in 2 Läufen auf der Sephadexsäule aufgetrennt. Das eingeengte Eluat (X) wurde auf 5 1-dim. Chromatogrammen im Isobuttersäurelaufmittel weiter getrennt.

2.1 Aminosäurezusammensetzung der gefundenen Vorstufen

Abbildung 3 zeigt das Schema eines Chromatogramms der UDP-aktivierten Mureinvorstufen vom ersten Trennungsschritt in Laufmittel VII.
Teile der UV-absorbiererden Banden wurden eluiert, 5 Std. in 5 N HCl bei 100°C hydrolysiert und auf ihre Aminosäurezusammensetzung geprüft (Tab.2). Von der breit verschmierten Bande Xb wurde jeweils ein schnell und ein langsam gelaufenes Stück Xb1 und Xb2 eluiert.
Die Banden Xb1 und Xb2 wurden dann in Äthanol/Ammoniumacetat zweimal über Nacht rechromatographiert (Abb.4).

Die stark UV-absorbierenden Banden wurden eluiert, hydrolysiert (5 N HCl, 5 Std. bei 100°C) und auf ihre Aminosäurezusammensetzung geprüft (Tab.3).

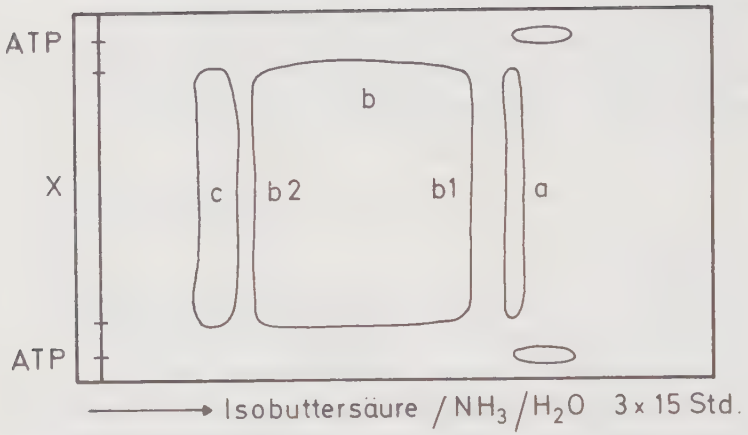


Abb.3:Schema eines Chromatogramms des Eluats X in Laufmittel VII.Eingezeichnet sind die UV-absorbierenden Zonen.

Tab.2:Aminosäurezusammensetzung der UV-absorbierenden Banden aus derersten chromatographischen Trennung.

µMol/mgZW Molverh.	Mur	Ala	Glu	Lys	Thre
Xa	0,265	0,565	0,220	sehr	0,061
	1,2	2,6	1	wenig	0,3
Xb1	0,467	0,797	0,299	0,253	-
	1,56	2,67	1	0,85	-
Xb2	0,264	0,535	0,353	0,100	-
	0,75	1,52	1	0,28	-
Xc	0,064	0,109	0,082	-	-
	0,78	1,33	1	-	-

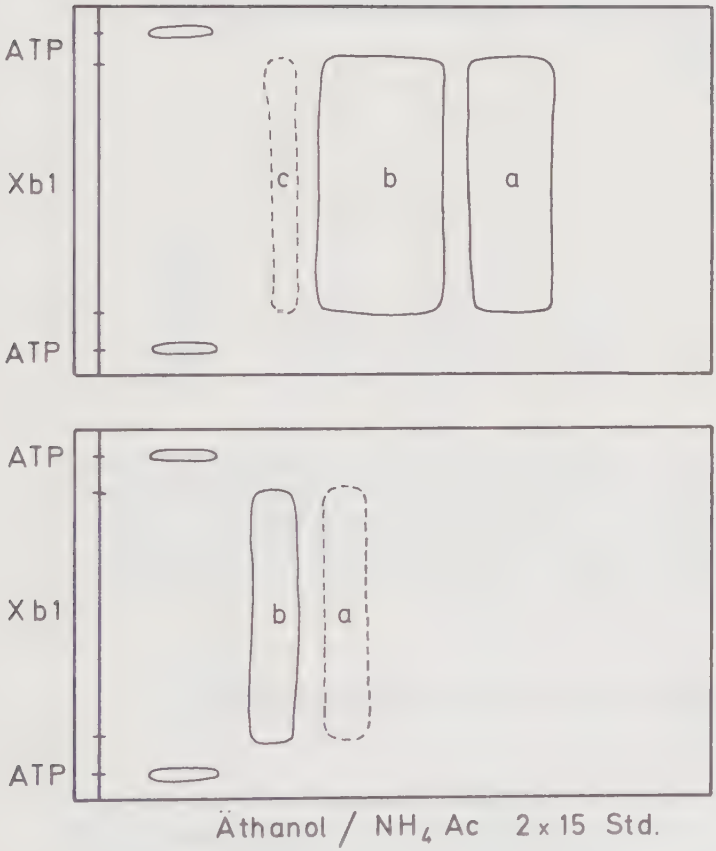


Abb.4:Schema der Chromatogrammevon der Auftrennung der Banden Xb1 und Xb2 in Äthanol/Ammoniumacetat.

Tab.3:Aminosäurezusammensetzung der UV-absorbierenden Banden aus der zweiten chromatographischen Trennung der Vorstufen.

µMol/mgZW Molverh.	Mur	Ala	Glu	Lys
Xb1 a	+	-	-	-
Xb1 b	0,020	0,054	0,020	0,010
	1	2,7	1	0,5
Xb2 b	0,077	0,189	0,121	0,055
	1,2	2,95	1,89	0,86

Bande Xb1 a besteht danach vermutlich aus UDP-N-Acetylmuramylsäure,in Bande Xb1 b ist neben noch nicht abgetrennten Vorstufen das UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid enthalten.Bande Xb2 b besteht offenbar aus einem UDP-N-Acetylmuramyl-Hexapeptid.

2.2 Strukturnachweis für das UDP-N-Acetylmuramyl-Hexapeptid.

Es sollte zuerst nachgewiesen werden,ob es sich der Struktur nach um eine UDP-aktivierte Mureinvorstufe handelt.Die weiteren Untersuchungen sollten die Struktur des Peptidanteils der Verbindung klären.Die Bande Xb2 b wurde von allen Chromatogrammen eluiert,eingeengt und in 3,5 ml dest.Wasser aufgenommen.

2.21 Nachweis des Uridins

a)Spektrum und Extinktionsquotient:
Von der Probe wurden 0,1 ml +2,9 ml Wasser eingesetzt. Als Vergleich diente eine Lösung von 0,2 µMol Uridinmonophosphat in 3 ml Wasser.Das Spektrum der beiden

Lösungen zeigt Abbildung 5.

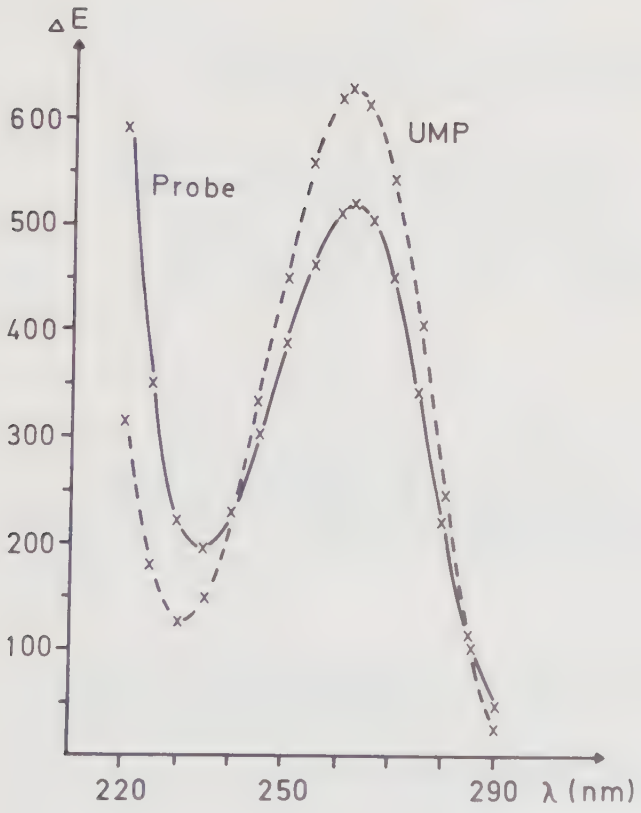


Abb.5:Spektrum von 0,2 µMol UMP in 3 ml Wasser und von 0,1 ml Probe in insgesamt 3 ml Wasser.

Die Werte der für Uridin charakteristischen Quotienten aus den Extinktionen bei verschiedenen Wellenlängen sind in Tabelle 4 berechnet.

Tab.4:Quotienten aus den Extinktionen bei verschiedenen Wellenlängen von Probe und UMP-Vergleichslösung.

	275/260	250/260	280/260	290/260
Probe	0,67	0,76	0,42	0,09
UMP-Lösung	0,66	0,73	0,40	0,04

b)Quantitative Bestimmung

Der Vergleich der Extinktionen der Probelösung und der UMP-Lösung bei 262 nm ergab eine Menge von 0,16 µMol Uridin in 0,1 ml Probelösung.

2.22 Phosphatbestimmung

0,1 ml Probelösung enthielt an Gesamtphosphat 0,4 µMol
an säurelabilem Ph. 0,165 µMol

2.23 Struktur des Peptidanteils

a)Aminosäurezusammensetzung

Tabelle 5 zeigt die Menge an Aminosäuren im Totalhydrolysat von 0,1 ml Probe.

Tab.5:Aminosäurezusammensetzung in 0,1 ml Probe

	Mur	Ala	Glu	Lys
µMol in 0,1ml	0,165	0,380	0,258	0,116
Molverh.	1,28	2,9	2	0,9

b)Konfigurationsbestimmung der Glutaminsäure

In 0,1 ml Probe mit 0,258 µMol Glutaminsäure wurden 0,008 µMol L-Glutaminsäure gefunden,das entspricht etwa 3% der Gesamtglutaminsäure.Die Probe enthält also praktisch nur D-Glutaminsäure.

c)Konfigurationsbestimmung von Alanin

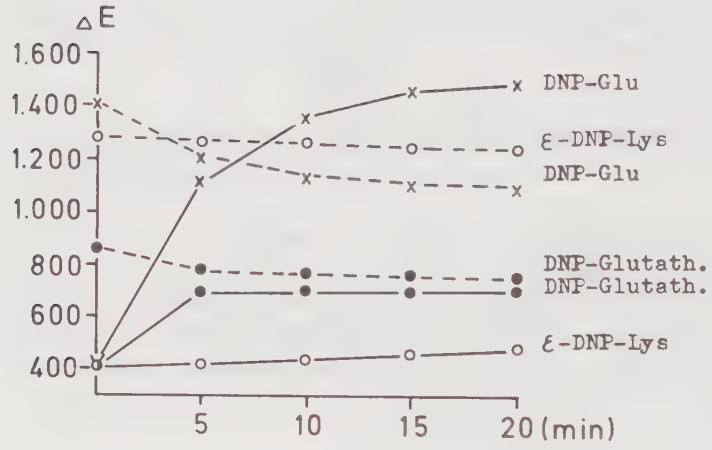
Durch einstündige Behandlung der Probe mit D-Aminosäureoxidase sank der Wert von Alanin von 0,570 µMol in 0,15 ml Lösung auf 0,266 µMol,das heißt,von 2,9 µMol Gesamtalanin pro Peptideinheit bestanden 1,7 µMol aus D-Alanin.Ein Mol Vorstufe enthält also 1 Mol L-Alanin und 2 Mol D-Alanin.

d)Dinitrophenylierung der Vorstufe

Die Dinitrophenylierung ergab neben Spuren von ε-DNP-Lysin nur DNP-Glutaminsäure.Da keine DNP-Muraminsäure auftrat,kann angenommen werden,daß die Muraminsäure wie gewöhnlich N-acetyliert vorliegt.

e)Photolyse der DNP-Vorstufe

Der Verlauf der Photolyse der DNP-Vorstufe wird in Abbildung 6 gezeigt.Da bereits die Photolyse von kleineren DNP-Peptiden nicht so starke Extinktionsveränderungen



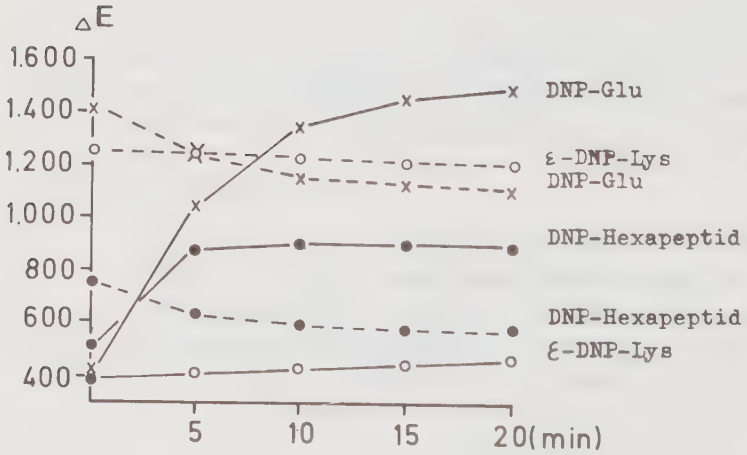


Abb.6:Photolyse von DNP-Glutathion und DNP-Hexapeptid. Als positive Kontrollsubstanz wurde DNP-Glutaminsäure verwendet,als negative ε-DNP-Lysin.

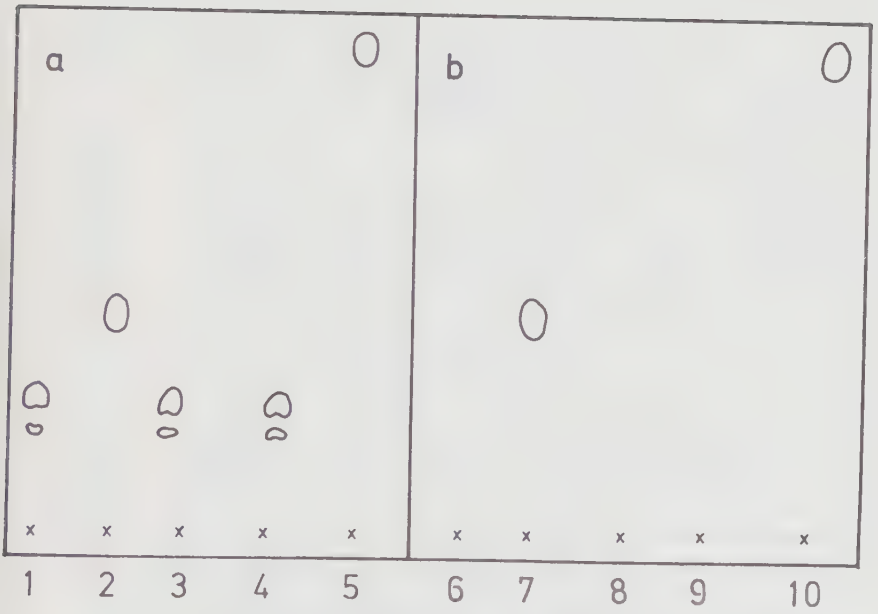


Abb.7: Dünnschichtchromatogramm auf Zellulose, in Laufmittel Propanol/0,2% NH_3 für 4,5 Std., der totalhydrolysierten Proben und Standards vor (a) und nach (b) Photolyse.
1=DNP-Glu, 2=DNP-Lys, 3=DNP-Glutath., 4=DNP-Hexapeptid, 5=DNP-OH, 6=DNP-Glu, 7=DNP-Lys, 8=DNP-Glutath., 9=DNP-Hexapeptid, 10=DNP-OH.

ergibt, auch wenn sie positiv ist, wie die Photolyse der freien DNP-Aminosäure, haben wir als Vergleich zu unserem größeren Peptid Glutathion dinitrophenyliert und den Photolysebedingungen unterworfen. Glutathion besitzt eine N-terminale Glutaminsäure, deren α-Carboxylgruppe frei ist. Das DNP-Derivat müßte also im UV-Licht gespaltet werden. Ist die α-Carboxylgruppe unserer dinitrophenylierten Glutaminsäure im Hexapeptid frei, so muß sich eine ähnliche Extinktionsänderung im UV-Licht ergeben wie bei DNP-Glutathion.
Zur Kontrolle der photolytischen Zerstörung der DNP-Glutaminsäure wurde je ein Aliquot der Proben und des Standards vor und nach der Photolyse hydrolysiert, auf eine Zellulosedünnschichtplatte aufgetragen und in Propanol/Ammoniak chromatographiert. Bei positiv verlaufener Photolyse sollte die DNP-Aminosäure der Probe im Hydrolysat nicht mehr nachzuweisen sein (Abb.7). Die Extinktionsänderungen während der UV-Bestrahlung sind bei DNP-Glutathion und der DNP-Vorstufe in der gleichen Größenordnung. Nach der Photolyse ist keine DNP-Glutaminsäure mehr nachzuweisen. Die Photolyse ist also positiv verlaufen, das heißt, die α-Carboxylgruppe der dinitrophenylierten Glutaminsäure ist frei. Die Peptidbindung an die Vorstufe muß also über die γ-Carboxylgruppe erfolgen.

f) Partialhydrolyse der Vorstufe

Das 15min. Partialhydrolysat der Vorstufe in 4N HCl bei 100°C wurde papierchromatographisch 2-dimensional aufgetrennt (Abb.8). Die Peptide wurden nach ihrer Lage identifiziert (Schleifer und Kandler 1970).
Es liegen die gleichen Peptide vor, die im Partialhydrolysat der Zellwand auf das Tetrapeptid N-Acetylmuramyl - L-Alanyl -γ- D-Glutamyl - L-Lysyl - D-Alanin schließen ließen, nämlich die Peptide Mur - L-Ala - - D-Glu (5), L-Ala - D-Glu (4), γ-D-Glu - L-Lys (7) und

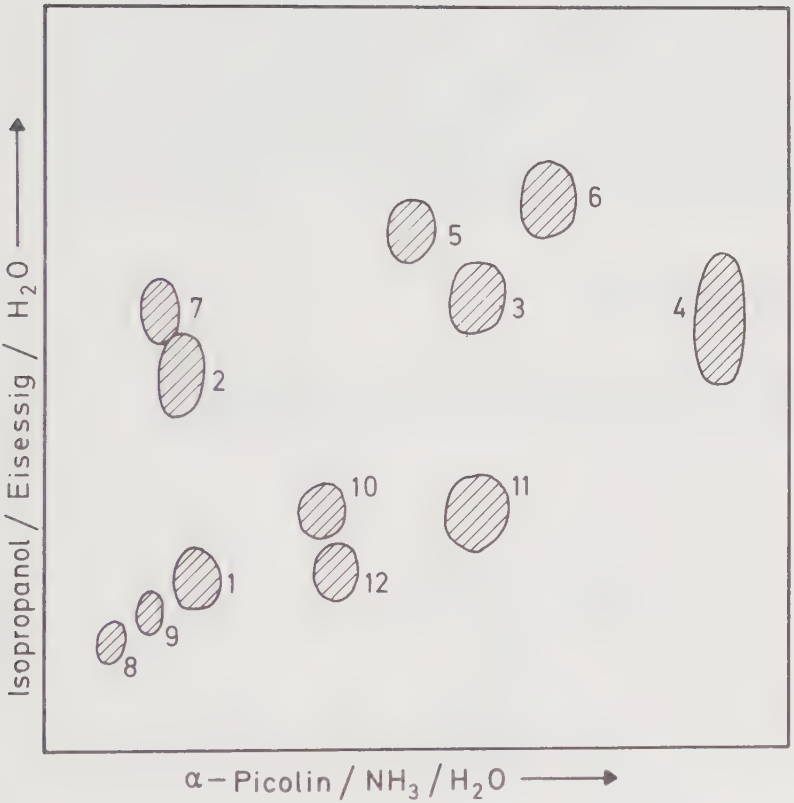


Abb.8:Schema eines Papierchromatogramms des 15 min. Partialhydrolysats der Vorstufe Xb2 b.
1=Lys,2=Glu,3=Ala,4=Mur,5=Mur-L-Ala - D-Glu,6=D-Ala - D--Ala,7=L-Ala - D-Glu,8=γ-D-Glu - L-Lys,9=N^6-γ- D-Glu -- L-Lys,10=L-Lys - D-Ala,11=L-Lys - D-Ala - D-Ala,12=unbestimmt.

L-Lys - D-Ala (9).Zusätzlich treten die Peptide L-Lys - - D-Ala - D-Ala (11) und D-Ala - D-Ala (6) auf,die darauf hinweisen,daß ein normales Pentapeptid mit dem Di-D-Alanin am C-terminalen Ende vorliegt.Auf die Bindung des zweiten Mols Glutaminsäure in der Vorstufe weist das Peptid N^6-γ-D-Glu - L-Lys (8) hin.Sie ist wie in der fertigen Zellwand mit der γ-Carboxylgruppe an die ε-Aminogruppe des Lysins gebunden.

2.3 Zusammenfassung

Bei der Mureinvorstufe Xb2 b,die aus Brevibacterium incertum ATCC 8363 in der stationären Wachstumsphase

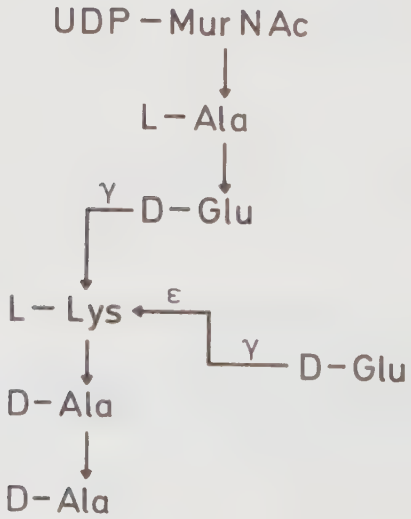


Abb.9:Struktur des UDP-N-Acetylmuramyl-Hexapeptids.

neben normalen UDP-aktivierten Vorstufen isoliert wurde, handelt es sich aufgrund der vorstehenden Ergebnisse um ein Uridindiphosphat - N-Acetylmuramyl - - Hexapeptid. Aufgrund der dinitrophenylierten Vorstufe, dem Photolyseergebnis und dem Chromatogramm des Partialhydrolysats der Vorstufe kann auf die Struktur in Abbildung 9 geschlossen werden.

c) Diskussion

Beim Murein von Brevibacterium incertum handelt es sich um den zuerst bei Planokokken beschriebenen L-Lys-D-Glu-Typ. Ungewöhnlicherweise tritt unter den Vorstufen auch ein UDP-N-Acetylmuramyl-Hexapeptid auf, das an der ε-Aminogruppe des Lysins bereits die D-Glutaminsäure der Interpeptidkette gebunden hat. Das Vorkommen einer derartigen Verbindung steht im Widerspruch zu der allgemeinen Vorstellung, Daß die Aminosäuren der Interpeptidbrücke erst in dem Stadium an das Pentapeptid angehängt werden, in dem dieses an ein Isoprenoidalkohol-Phosphat gebunden ist. Daß es Ausnahmen von dieser Regel gibt, wurde von Plapp und Strominger 1970a an einem Stamm von Lactobacillus viridescens gezeigt. Sie konnten schon auf das nukleotidaktivierte Muramylpentapeptid eine Aminosäure der Interpeptidbrücke übertragen. Im Murein dieses Stammes bildet ein Dipeptid aus Alanin und Serin die Interpeptidbrücke. Eine lösliche Fraktion des Zellextraktes des Bakteriums katalysiert nun unspezifisch die Bindung einer dieser Aminosäuren an das UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid, wobei die Aminosäure mit Transfer-RNS aktiviert werden muß. Beim Anhängen einer D-Aminosäure wie im Fall von D-Glutaminsäure von Brevibacterium incertum wird die Aktivierung wahrscheinlich analog zur Aktivierung der D-Asparaginsäure bei Sc. faecalis und Lb. casei (Staudenbauer 1968) nicht mit t-RNS sondern über die Bildung des Hydroxamats der D-Aminosäure erfolgen. Bei Plapp und Strominger war dann nur das entstandene UDP-N-Acetylmuramyl-Hexapeptid, nicht aber das Pentapeptid im Stande mittels des Phospholipids in vitro Murein zu bilden.
Neben dem in der Einleitung erwähnten, bei Sc. faecalis gefundenen Hexapeptids und dem von Plapp und Strominger in vitro hergestellten Hexapeptidvorstufe, ist das aus Brevibacterium incertum isolierte UDP-N-Acetylmuramyl-

Hexapeptid der dritte Fall einer Mureinvorstufe,die schon in der UDP-aktivierten Form eine Aminosäure der Interpeptidbrücke trägt.

IV. Ein neuer Typ einer Peptiduntereinheit bei Arthrobacter Stamm J 39

a) Einleitung

Die meisten bisher bekannten Mureintypen enthalten ein Mol Glutaminsäure pro Mol Peptiduntereinheit.Wenn zusätzliche Glutaminsäure gefunden wird,ist sie in der Interpeptidkette lokalisiert,wie bei den Mikrokokken Mc.freudenreichii und Mc.luteus (Niebler et al.1969), bei den Planokokken (Schleifer und Kandler 1970) und Sarcina ureae (Bogdanovsky et al.1971).Im Murein von Arthrobacter Stamm J 39,der von Keddie et al.1966 isoliert wurde,wurden zwei Mol Glutaminsäure pro Mol Peptiduntereinheit gefunden.Daraufhin wurde die Struktur des Mureins näher untersucht.Es zeigte sich,daß im Gegensatz zu allen anderen bisher aufgeklärten Mureinen,die mehr als ein Mol Glutaminsäure pro Mol Peptiduntereinheit enthalten,das zweite Mol Glutaminsäure nicht einen Teil der Interpeptidkette darstellt,sondern im Tetrapeptid enthalten ist.

b) Ergebnisse

1. Aminosäurezusammensetzung des Mureins

1.1 Quantitative Aminosäurezusammensetzung

Es wurden drei verschiedene Zellwandaufarbeitungen A,B und C untersucht.Tabelle 6 zeigt die Aminosäurezusammensetzung in den Hydrolysaten.

Tab.6:Absolute Mengen und molares Verhältnis der Aminosäuren in drei verschiedenen Zellwandaufarbeitungen A,B und C von Stamm J 39.

	µMol/mg ZW			molares Verhältnis Glu + Hyg = 2		
	A	B	C	A	B	C
Mur	0,149	0,112	0,168	0,91	0,79	0,84
Glu	0,327	0,227	0,312	1,53	1,60	1,55
Hyg	0,100	0,058	0,090	0,47	0,40	0,45
Gly	0,655	0,433	0,594	3,06	3,04	2,96
Ala	0,191	0,133	0,177	0,89	0,94	0,88
Lys	0,240	0,155	0,216	1,12	1,09	1,07
$GlcNH_2$	0,206	0,136	0,237	0,96	0,96	1,18
NH_3	0,127	0,097	0,084	0,60	0,68	0,42
Ser	0,027	0,021	0,027	0,13	0,15	0,13

1.2 Identifizierung der Hydroxyglutaminsäure

Die threo-3-Hydroxyglutaminsäure wurde aufgrund der Erfahrungen in unserem Arbeitskreis nach den R_{Ala}-Werten

auf Papierchromatogrammen und dem Elutionsvolumen am Aminosäureanalysator identifiziert (Schleifer et al.1967b).

1.3 Ammoniakgehalt

Das Freiwerden von geringen Mengen an Ammoniak (weniger als 1 Mol proMol Peptiduntereinheit) bei Totalhydrolyse der Zellwand ist auf die Zerstörung von Aminozuckern zurückzuführen,und nicht auf die Freisetzung von amidgebundenem Ammoniak.das ließ sich an Hand von Kurzzeithydrolysen in 4N HCl bei 100°C nachweisen.Bei einer Hydrolysedauer von 4 Std. wurden nur 0,3 Mol Ammoniak pro Mol Peptiduntereinheit gefunden,bei einstündiger Hydrolyse waren nur Spuren von Ammoniak nachzuweisen.

1.4 Konfigurationsbestimmung von Aminosäuren

a)Lysin

Nach der Messung der optischen Rotationsdispersion des DNP-Derivats lag Lysin in der L-Form vor.

b)Alanin

Das Alanin lag in den Zellwandaufarbeitungen A und B nur in der D-Konfiguration vor.Zellwand C wurde nihht untersucht.

c)Glutaminsäure

Die Konfigurationsbestimmung der Glutaminsäure ergab 1 Mol L-Glutaminsäure und 0,53 Mol D-Glutaminsäure pro Mol Peptiduntereinheit.

1.5 C-terminale Aminosäuren

Die Hydrazinolyse ergab, daß nur Lysin in größerer Menge C-terminal vorliegt.

1.6 N-terminale Aminosäuren

Die DNP-Zellwand wurde total hydrolysiert und dünnschichtchromatographisch auf Zelluloseplatten in Laufmittel IV aufgetrennt. Als einzige DNP-Aminosäure trat ε-DNP-Lysin auf.
Die quantitative Bestimmung des dinitrophenylierbaren Lysins ergab im Vergleich von dinitrophenylierter und nicht dinitrophenylierter Zellwand (Tab.7) eine Abnahme an Lysin von 0,051 µMol/mg Zellwand. Bei 0,225 µMol Gesamtlysin/mg Zellwand bedeutet das eine Abnahme um 23%.

Tab.7: Vergleich der Aminosäurezusammensetzung von dinitrophenylierter und nicht dinitrophenylierter Zellwand des Stammes J 39.

	Mur	Glu	Hyg	Ala	Lys	Gly
µMol/mgZW	0,150	0,300	0,126	0,186	0,225	0,651
Molverh.	0,70	1,41	0,59	0,87	1,06	3,06
µMol/mgDNP-ZW	0,155	0,284	0,111	0,183	0,174	0,591
Molverh.	0,78	1,44	0,56	0,93	0,88	2,99

2. Mureinvorstufen

Bei der Endgruppenbestimmung war überraschend, daß nicht die zusätzliche L-Glutaminsäure N-terminal vorlag, sondern Lysin. Lysin trat außerdem in großen Mengen als C-terminale Aminosäure auf, was bei normaler Position im Tetrapeptid nicht der Fall sein dürfte. Deswegen war anzunehmen, daß das Lysin wie bei Butyribacterium rettgeri (Guinand et al. 1969) und Microbacterium lacticum (Schleifer et al. 1968) an der Quervernetzung beteiligt ist, während die entsprechende Stellung im Tetrapeptid durch L-Glutaminsäure besetzt sein könnte. Um dies zu untersuchen wurden die Mureinvorstufen isoliert.

2.1 Isolierung der Vorstufen

Zur Anreicherung des UDP-N-Acetylmuramyl-Tripeptids wurde den Organismen in der Massenkultur bei einer optischen Dichte von 1 bei 578 nm 100 µg/ml D-Cycloserin zugesetzt. Abbildung 10 zeigt, daß die Zellen nach der Cycloserinzugabe noch etwa drei Stunden nur leicht gehemmt weiter wachsen, bevor die lysierenden Zellen überwiegen und die Trübung der Kultur abnimmt. Zur Vorstufengewinnung wurden die Zellen 1,5 Std. nach Zugabe des Antibiotikums geerntet.
Bei der Aufarbeitung der Zellen, die mit Cyclossrin inkubiert worden waren, erhielten wir im Elutionsprofil der Sephadexsäule (Abb. 11) zwei UV-absorbierende Peaks I und II, die die gesamte im Extrakt enthaltene Menge an Aminozucker enthielten. Eine Kontrollkultur, deren Wachstum nicht durch Antibiotikumzusatz gehemmt

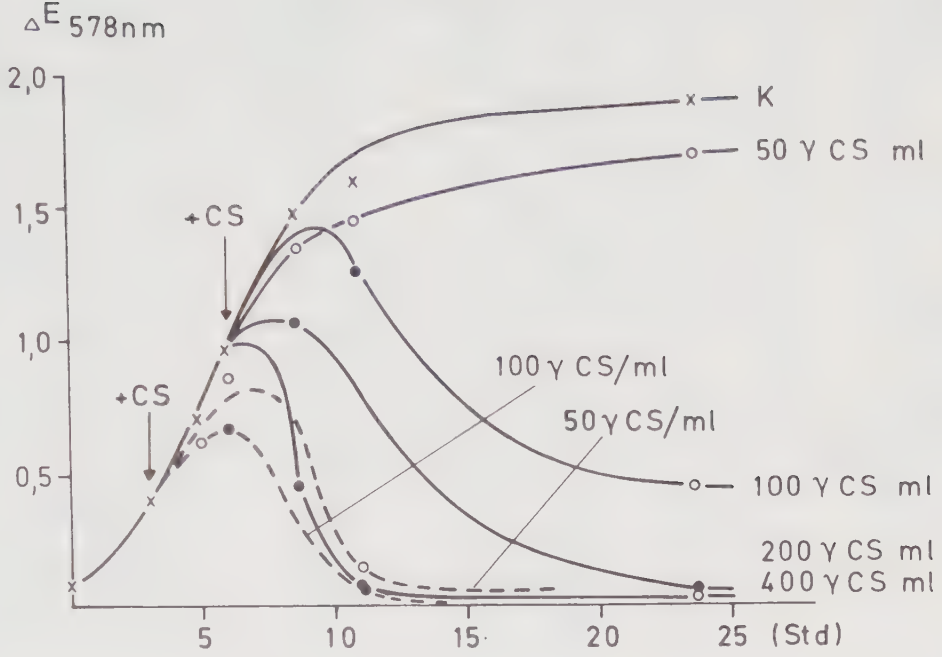


Abb.10:Wachstumskurven von Stamm J 39 ohne Antibiotikum (K) und mit verschiedenen Konzentrationen an D-Cycloserin;Zugabe des Antibiotikums bei o.D. 0,4 und 1,0 (578nm).

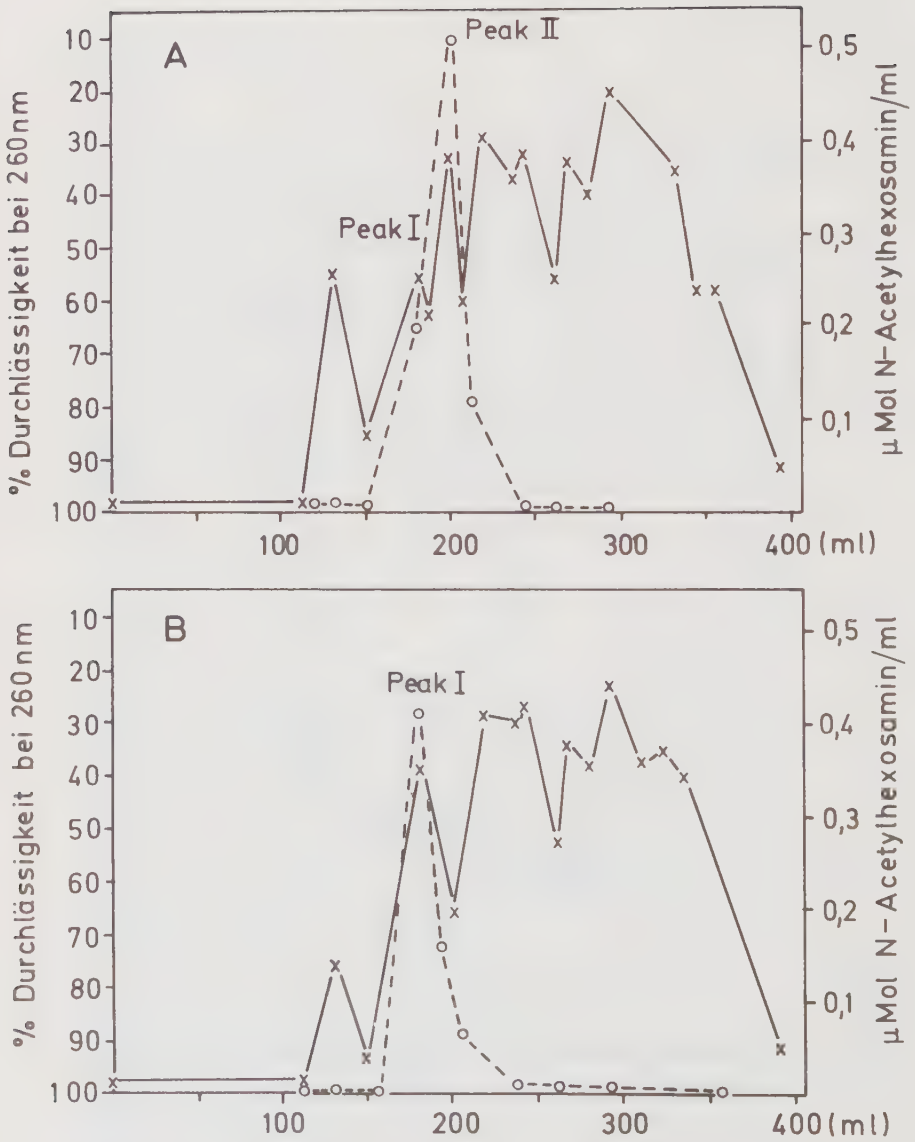


Abb.11:Trennung des TES-Extraktes an Sephadex G25.(A) Kultur mit D-Cycloserin,(B) ohne Antibiotikum;ausgezogene Linie:Prozent Durchlässigkeit bei 260nm;gestrichelte Linie: N-Acetylhexosamin.

worden war, lieferte nur Peak I.
Bei der papierchromatographischen Trennung in Laufmittel VII ergab die Hauptmenge an UV-absorbierendem Material von Peak I eine Bande mit einem R_{ATP} von 0,6, die Hauptmenge an UV-absorbierendem Material von Peak II eine Bande mit einem R_{ATP} von 0,4. Mit Ninhydrin war keine Farbreaktion zu beobachten.

2.2 Aminosäurezusammensetzung

Die UV-absorbierenden Banden wurden eluiert, je ein Aliquot hydrolysiert (5N HCl, 5 Std. bei 100°C) und auf die Aminosäurezusammensetzung untersucht.
Die molaren Verhältnisse der Aminosäuren zeigen (Tab.7), daß Peak I hauptsächlich das Nukleotidpentapeptid enthielt, Peak II dagegen das Nukleotidtripeptid. Hydroxyglutaminsäure wurde in den Vorstufen nicht gefunden. Die Glutaminsäure scheint im Lauf der Biosynthese später hydroxyliert zu werden (Schleifer et al. 1967a).

Tab.7: Aminosäurezusammensetzung des UV-absorbierenden Mateials, isoliert aus Peak I und II des Eluats der Sephadexsäule und papierchromatographisch gereinigt in Laufmittel VII.

	µMol/Probe				Molverhältnis			
	Mur	Glu	Gly	Ala	Mur	Glu	Gly	Ala
Peak I	0,076	0,138	0,075	0,133	1,1	2	1,09	1,93
Peak II	0,314	0,579	0,267	-	1,09	2	0,95	-

(Die Werte für Muraminsäure wurden um 10% verkleinert, da es sich erwiesen hatte, daß die normal verwendete Konstante für Muraminsäure für die Hydrolysebedingungen:

5N HCl,5 Std. 100°C zu klein ist. Die berechneten Wert fallen durchwegs um 10% zu hoch aus. Da keine authentische Muraminsäure zur Verfügung stand, konnte die genaue Konstante nicht ermittelt werden.)

2.3 Konfiguration von Glutaminsäure und Alanin

Die enzymatische Bestimmung der L-Glutaminsäure an dem Nukleotidpentapeptid ergab für eine Probe mit 3,94µMol Gesamtglutaminsäure/ml 2,16µMol L-Glutaminsäure/ml. Alanin wurde nur in der D-Konfiguration gefunden.

2.4 Nachweis der UDP-aktivierten Vorstufe

Der Nachweis, daß es sich bei den Substanzen aus Peak I und II tatsächlich um UDP-aktivierte Mureinvorstufen handelt, soll an dem Nukleotidtripeptid erbracht werden.

2.41 Nachweis des Uridins

a) Spektrum und Extinktionskoeffizient

Die Abbildung 12 zeigt das Spektrum der Vorstufe im Vergleich zum Spektrum einer UMP-Lösung (0,05 µMol/ml). Die daraus folgenden Quotienten sind in Tabelle 8 angeführt.

Tab.8: Quotienten, gebildet aus den Extinktionen verschiedener Wellenlängen von Vorstufe und UMP-Lösung.

	275/260	250/260	280/260	290/260
Vorstufe	0,652	0,744	0,410	0,071
UMP	0,645	0,730	0,349	0,040

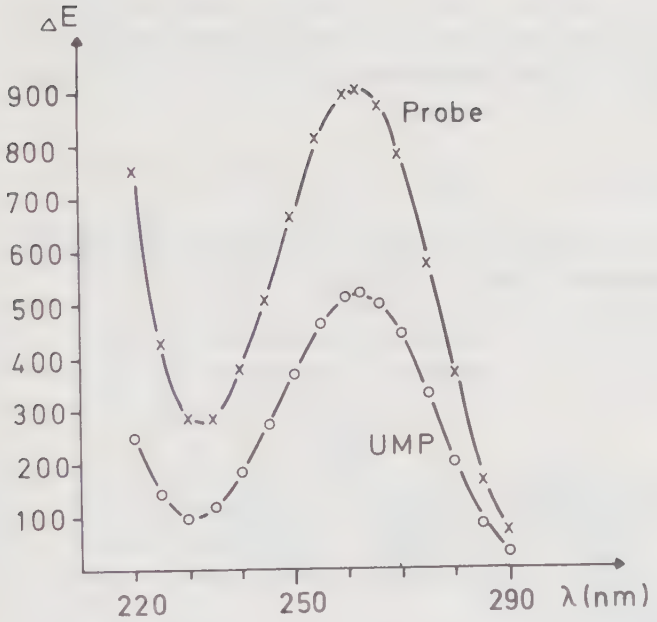


Abb.12: Spektrum der Vorstufe und einer UMP-Lösung (0,05 µMol/ml)

b) Quantitative Bestimmung des Uridins

Der Vergleich der Extinktionen der Probelösung mit der UMP-Lösung ergab in der Probe 0,528 µMol Uridin/ml.

2.42 Phosphatbestimmung

Es wurden 1,084 µMol Totalphosphat und davon 0,607 µMol säurelabiles Phosphat pro ml gefunden.

2.43 Morgan-Elson Test

Der Morgan-Elson Test ergab 0,67 µMol N-Acetylhexosamin, berechnet nach der Eichkurve von N-Acetylglukosamin. Der Wert ist zu hoch, da N-Acetylmuraminsäure eine etwas stärkere Farbreaktion auslöst.

2.44 Peptidanteil

Nach Werten des Aminosäureanalysators waren 0,615 µMol Peptiduntereinheit pro ml enthalten.

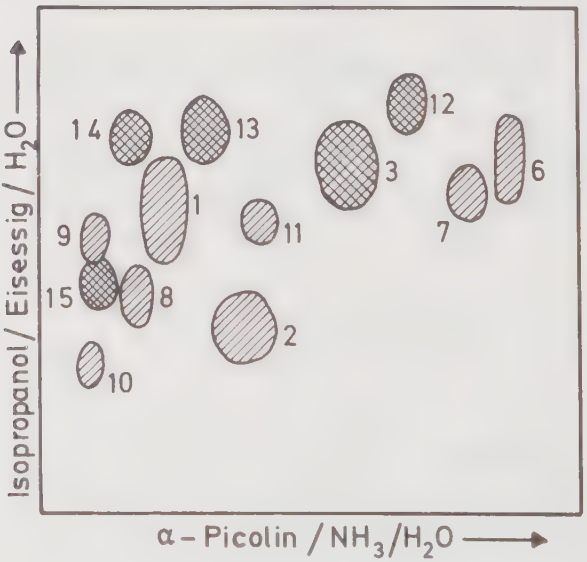


Abb.13: Schema eines Papierchromatogramms von 5min. Partialhydrolysaten des UDP-N-Acetylmuramylpentapeptids und des -tripeptids, isoliert aus Stamm J39.
1=Glu; 2=Gly; 3=Ala; 6=Mur; 7=Mur-Gly; 8=Gly-D-Glu; 9=γ-D-Glu-L-Glu; 10=Gly-γ-D-Glu-L-Glu; 12=D-Ala-D-Ala; 13=L-Glu-D-Ala-D-Ala; 14=L-Glu-D-Ala; 15=Gly-γ-D-Glu-L-Glu-D-Ala-D-Ala; doppelte Schraffierung: Aminosäuren und Peptide, die nur im Hydrolysat des Pentapeptids gefunden wurden.

Bei der untersuchten Verbindung wurden also pro Mol Peptiduntereinheit 1 Mol Uridin, 2 Mol Phosphat, davon 1 Mol säurelabiles Phosphat und 1 Mol N-Acetylhexosamin nachgewiesen. Das entspricht der üblichen Zusammensetzung einer UDP-aktivierten Mureinvorstufe.

2.5 Partialhydrolysate der Vorstufen

Die beiden Mureinvorstufen wurden jeweils 5min. in 4N HCl bei 100°C hydrolysiert und papierchromatographisch 2-dimensional in Laufmittel I und II aufgetrennt (Abb.13). Die einzelnen Peptide wurden aus Parallelchromatogrammen eluiert und untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Die Peptide Muramylglycin (7), Glycyl - D-Glutaminsäure (8), γ- D-Glutamyl - L-Glutaminsäure (9) und Glycyl -γ- D-Glutamyl - L-Glutaminsäure (10) beweisen die folgende Struktur des N-Acetylmuramyl-Tripeptids:

N-Acetylmuramylglycyl -γ- D-Glutamyl - L-Glutaminsäure.

Im Partialhydrolysat der Pentapeptidvorstufe wurden zusätzlich D-Alanin und die Peptide D-Alanyl - D-Alanin (12), L-Glutamyl - D-Alanyl - D-Alanin (13), L-Glutamyl- - D-Alanin (14) und Glycyl -γ- D-Glutamyl - L-Glutamyl - - D-Alanyl - D-Alanin gefunden. Demzufolge besitzt das N-Acetylmuramyl-Pentapeptid folgende Struktur:

N-Acetylmuramylglycyl -γ- D-Glutamyl - L-Glutamyl - D-Alanyl - D-Alanin.

Tab.8: Aminosäurezusammensetzung und Struktur der Peptide aus den Partialhydrolysaten der Mureinvorstufen von Stamm J39.

Peptid Nr.	Aminosäuren (µMol/Probe)	Molverh.	Terminale Gruppen, Konfiguration, Photolyse	Peptidstruktur
7	Mur 0,050 Gly 0,049	1 1	Gly C-terminal	Mur - Gly
8	Gly 0,034 Glu 0,038	0,9 1	Gly N-terminal D-Glutaminsäure	Gly - D-Glu
9	Glu		Photolyse positiv	γ- D-Glu - L-Glu
10	Gly 0,018 Glu 0,039	1 2	Gly N-terminal	Gly -γ- D-Glu - L-Glu
12	Ala			D-Ala - D-Ala [a]
13	Glu 0,085 Ala 0,172	1 2	Photolyse negativ	L-Glu - D-Ala - D-Ala
14	Glu 0,135 Ala 0,136	1 1	L-Glu N-terminal	L-Glu - D-Ala
15	Gly 0,031 Glu 0,066 Ala 0,063	1 2 2	Gly N-terminal	Gly -γ- D-Glu - L-Glu - - D-Ala - D-Ala

[a] Schleifer et al. 1969

Tab.9: Aminosäurezusammensetzung und Struktur der Peptide aus einem Partialhydrolysat der Zellwand von Stamm J 39.

Peptid-Nr.	Aminosäure (µMol/Probe)	Mol-verh.	terminale Gruppe Konfiguration	Partialhydr. des Peptids	Peptidstruktur
8	Glu, 0,036	1	Gly N-term.		Gly - D-Glu
	Gly, 0,035	1	D-Glu		
9	Glu				γ- D-Glu - L-Glu
10	Glu, 0,112	1,8	Gly N-term.	Glu,Gly,Hgy,	Gly -γ- Hyg - L-Glu,
	Hyg, 0,034	0,4		Gly-Glu,	Gly -γ- D-Glu - L-Glu
	Gly, 0,063	1		Gly-Hyg	
14	Glu, 0,046	1	Glu N-term.		L-Glu - D-Ala
	Ala, 0,045	1	L-Glu,D-Ala		
16	Glu, 0,059	1	Glu N-term.		D-Glu - Gly[a]
	Gly, 0,057	1	D-Glu		
17	Glu, 0,018	0,7	Gly N-term.		Gly - D-Glu - Gly
	Gly, 0,040	2,2			
18	Hyg, 0,046	0,7	Gly N-term.		Gly - Hyg
	Gly, 0,067	1			
19	Gly,				Gly - Gly[b]
20	Ala, 0,051	1	Ala N-term.		N^6-D-Ala - L-Lys[c]
	Lys, 0,048	0,9			
21	Gly, 0,067	1	Gly N-term.		N^2-Gly - L-Lys
	Lys, 0,089	1,3			

Fortsetzung der Tabelle 9:

Peptid-Nr.	Aminosäure (µMol/Probe)	Molverh.	terminale Gruppe Konfiguration	Partialhydr. des Peptids	Peptidstruktur
22	Gly, 0,033	1,3	Gly N-term.		N^2-Gly -N^6- D-Ala - - L-Lys
	Ala, 0,026	1			
	Lys, 0,024	1			
23	Glu, 0,033	1		Glu,Lys,Ala, Glu-Ala, N^6-Ala-Lys	N^6- (L-Glu - D-Ala) - - L-Lys
	Ala, 0,035	1			
	Lys, 0,033	1			
24	Glu, 0,011	0,7	Gly N-term.	Gly,Glu,L-Glu--D-Ala,Gly-Lys,N^6-Ala-Lys	N^2-Gly - N^6-(L-Glu - - D-Ala)- L-Lys
	Gly, 0,015	1			
	Ala, 0,015	1			
	Lys, 0,014	0,9			

[a] Schleifer 1970a; [b] Schleifer et al.1969; [c] Schleifer et al.1968.

3. Partialhydrolysat der Zellwand

Ein 45min. Partialhydrolysat der Zellwand wurde papierchromatographisch aufgetrennt (Abb.14). Die Peptide wurden aus Parallelchromatogrammen isoliert und identifiziert. Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse.

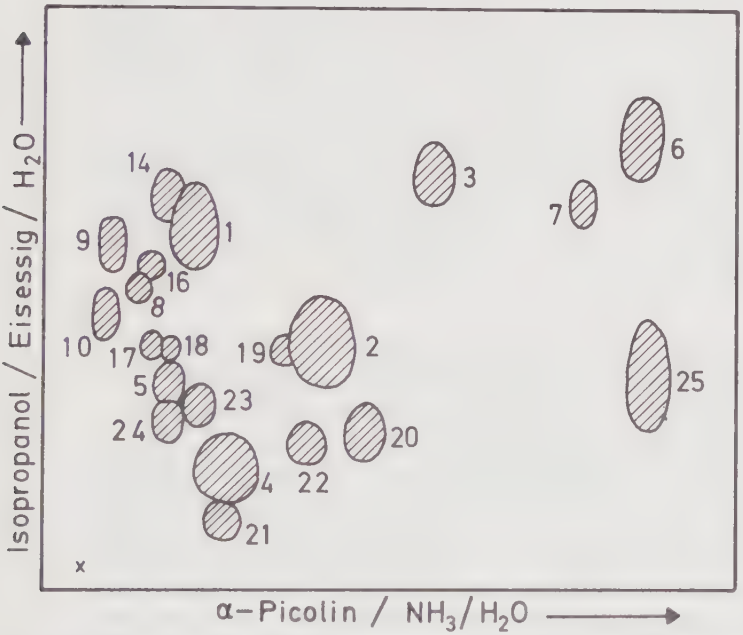


Abb.14: Schema des Chromatogramms eines 45min. Partialhydrolysats der Zellwand von Arthrobacter Stamm J39. 1=Glu; 2=Gly; 3=Ala; 4=Lys; 5=Hyg; 6=Mur; 7=Mur-Gly; 8=Gly-D-Glu; 9=γ-D-Glu-L-Glu; 10=Gly-γ-D-Glu-L-Glu; 14=L-Glu-D-Ala; 16=D-Glu-Gly; 17=Gly-D-Glu-Gly und Gly-Hyg-Gly; 18=Gly-Hyg; 19=Gly-Gly; 20=N^6-D-Ala-L-Lys; 21=N^2-Gly-L-Lys; 22=N^2-Gly,N^6D-Ala-L-Lys; 23=N^6-(L-Glu-D-Ala)-L-Lys; 24=N^2-Gly,N^6-(L-Glu-D-Ala)-L-Lys; 25=$GlcNH_2$;

c) Diskussion

Bei der Untersuchung der Mureinvorstufen von Stamm J39 hatte sich der Aufbau der Peptiduntereinheit als N-Acetylmuramylglycyl -γ-D-Glutamyl - L-Glutamyl - D-Alanyl-D-Alanin erwiesen. Das wurde nun durch die Peptide Gly - D-Glu, γ-D-Glu - L-Glu, Gly -γ-D-Glu - L-Glu und L-Glu - D-Ala bestätigt, die aus dem Partialhydrolysat der Zellwand isoliert wurden. Da nur Peptide gefunden wurden, die Glycin zusammen mit Hydroxyglutaminsäure enthalten, kommt nur die D-Glutaminsäure hydroxyliert vor. Das Verhältnis D-Glutaminsäure zu L-Glutaminsäure war etwa 0,5 : 1 statt wie in der Vorstufe 1 : 1. Das weist darauf hin, daß ungefähr die Hälfte der D-Glutaminsäure hydroxyliert ist.

Die Quervernetzung erfolgt zwischen der α-Carboxylgruppe der D-Glutaminsäure und dem D-Alanin einer benachbarten Peptiduntereinheit, und zwar über das Peptid Glycylglycyl - L-Lysin. Das Vorkommen eines Diglycins im Partialhydrolysat weist darauf hin, daß die α-Carboxylgruppe der Glutaminsäure mit zwei Mol Glycin substituiert ist. Da in der Vorstufe nur ein Mol Glycin gefunden werden konnte, hier in der Zellwand aber drei Mol Glycin pro Mol Lysin vorhanden sind, muß man annehmen, daß zwei Mol Glycin in der Interpeptidbrücke lokalisiert sind. Daß ein Glycin an die α-Carboxylgruppe der D-Glutaminsäure gebunden ist, zeigt das Vorkommen der Peptide D-Glutamyl-Glycin (16) und Glycyl - D-Glutamyl-Glycin (17). Die α-Aminogruppe des Lysins ist an Glycin gebunden, wie das Vorkommen des Peptids N^2-Glycyl - L-Lysin (21) beweist. Die ε-Aminogruppe des Lysins ist besetzt von der Carboxylgruppe eines D-Alanins. Das konnte mit Hilfe der Peptide N^6-D-Alanyl - L-Lysin (20) und N^2-Glycyl,N^6-D-Alanyl - L-Lysin (22) gezeigt werden.
Ein Ausschnitt aus der Primärstruktur des Mureins ist in Abbildung 15 dargestellt.

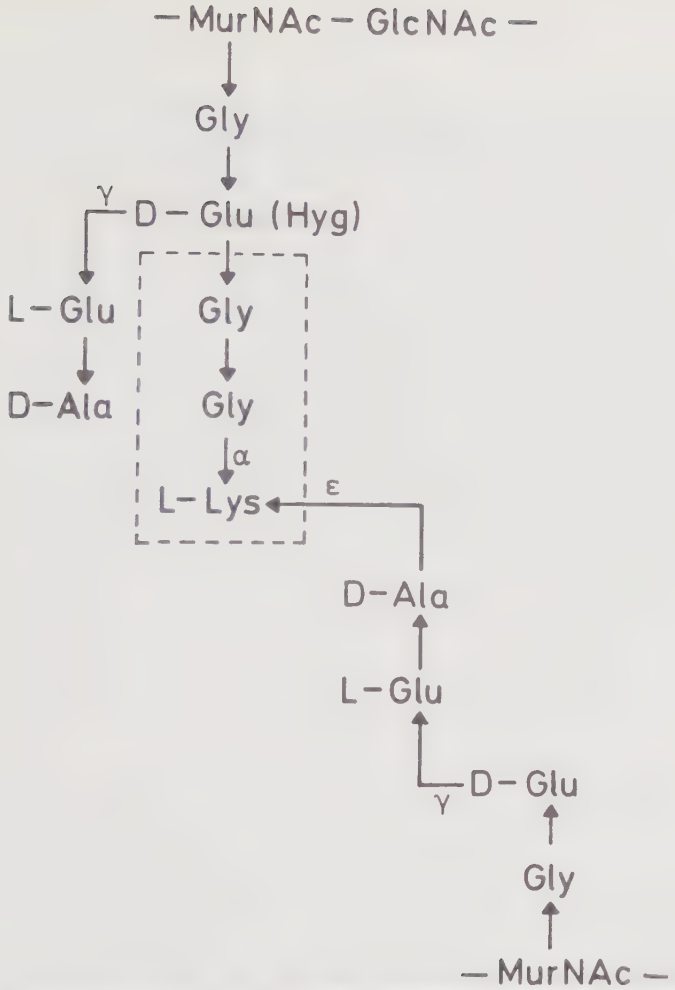


Abb.15: Ausschnitt aus der Primärstruktur des Mureins bei Arthrobacter J 39.

In den verschiedenen Zellwandaufarbeitungen wurde jeweils 0,1 Mol Serin proMol Peptiduntereinheit gefunden. Außerdem wurden in den Partialhydrolysaten geringe Mengen an Peptiden entdeckt, die Serin, Hydroxyglutaminsäure und Glycin enthielten. Das legt die Möglichkeit nahe, daß Serin zu einem kleinen Teil das Glycin im Murein ersetzt.

Das hier beschriebene Murein von Arthrobacter Stamm J 39 bildet zusammen mit dem Homoserin enthaltenden Typ von C.poinsettiae (Perkins 1967)die einzige Ausnahme von der bisher festgestellten Regel,daß in Position 3 des Tetrapeptids immer eine Diaminosäure steht.Und es ist der erste Fall,daß die Diaminosäure durch eine Dicarboxylsäure ersetzt ist.In Übereinstimmung mit allen anderen Mureintypen jedoch liegt die Glutaminsäure in der L-Konfiguration vor.Das entspricht der Erfahrung,daß in Position 3 des Tetrapeptids nur eine L-Aminosäure,beziehungsweise nur das L-Zentrum einer Aminosäure gebunden ist.Auf diese Weise bleibt in diesem sonst ungewöhnlichen Murein die Aufeinanderfolge von abwechselnd D- nnd L-Aminosäuren im Tetrapeptid gewahrt.

V. Eine glukosaminhaltige Peptiduntereinheit im Murein von Arthrobacter Stamm J 73

a) Einleitung

Glycoproteide und Glycopeptide, Verbindungen, bei denen Protein und Kohlenhydrat kovalent aneinander gebunden sind, sind im Pflanzen- und Tierreich weit verbreitet (Montgomery 1970). Während sie bei den höheren Tieren gut untersucht sind, weil sie dort in großer Menge vorkommen, sind sie bei niederen Organismen weniger häufig beschrieben. Besonders gut untersucht ist hier das Mannanglycopeptid aus der Zellwand der Hefen (Sentandreu und Northcote 1968, 1969). Eine Reihe von Glycoproteiden wurde bei wirbellosen Tieren beschrieben (Übersicht bei Hunt 1970), und bei Aspergillusarten wurden Glycoproteide als Enzyme nachgewiesen (Übersicht bei Montgomery 1970). Von einem Vorkommen von Glycoproteiden und Glycopeptiden bei Prokaryonten war bisher allerdings wenig bekannt, wenn man vom Murein absieht, bei dem es sich um eine ganz eigene Bindungsart zwischen dem Zuckeranteil und den Peptiden handelt. Das Auftreten eines bakteriellen Glycopeptids wird von Strobel et al. 1972 näher beschrieben. Es wird von dem pflanzenpathogenen Bakterium Corynebacterium sepedonicum ausgeschieden und hat phytotoxische Wirkung. Die Bindung zwischen Kohlenhydrat- und Peptidanteil erfolgt durch die O-glycosidische Bindung eines Mannoserestes an Threonin. Im folgenden wird gezeigt, daß im Murein von Arthrobacter Stamm J 73 mindestens ein Zucker an die Peptiduntereinheit gebunden ist, und zwar analog zur O-glycosidischen Bindung bei Glycopeptiden an die Hydroxylgruppe einer Hydroxyaminosäure.

b) Ergebnisse

1. Mureinzusammensetzung

Der Stamm erschien makroskopisch auf der Agarplatte nicht in einheitlichen Kolonien. Neben gelben, durchsichtigen Kolonien traten schwach gelbliche, schleimige Kolonien auf. Im Phasenkontrastmikroskop waren bei beiden Kolonieformen die gleichen langen, stark verbogenen, teilweise verzweigten Stäbchen zu sehen. Sie unterschieden sich lediglich darin, daß die Organismen aus den gelben Kolonien in Knäueln zusammen lagen, die aus den schleimigen Kolonien immer einzeln. In der Aminosäurezusammensetzung des Mureins waren beide Kulturen gleich. Unterschiede in der Zellwand traten nur im Polysaccharid auf.

1.1 Aminosäurezusammensetzung

1.11 Qualitative Zusammensetzung

Die papierchromatographische Auftrennung eines normalen Totalhydrolysats der Zellwand (4N HCl, 100°C, 16 Std.) ergab neben den Aminosäuren Ornithin, Glutaminsäure, Hydroxyglutaminsäure, Glycin, Alanin und Homoserin und dem schwerer hydrolysierbaren Peptid Orn - D-Ala zwei, der Lage nach unbekannte Flecken, die erst auf dem Chromatogramm des stärkeren Hydrolysats (6N HCl, 120°C, 16 Std.) verschwunden waren (Abb.16).

1.12 Quantitative Zusammensetzung

Normalerweise fielen in den Läufen des Aminosäureanalysators die Peaks von Muraminsäure und Homoserin zusammen. Nur in seltenen Fällen wurden die beiden Peaks etwas getrennt, sodaß eine Auswertung erfolgen konnte.

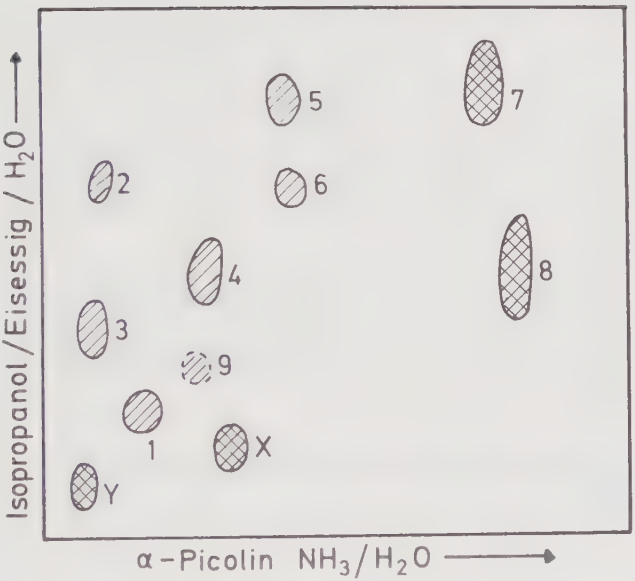


Abb.16: Schema des Papierchromatogramms eines normalen und eines verstärkten Totalhydrolysats der Zellwand von Stamm J73.
1 = Orn; 2 = Glu; 3 = Hyg; 4 = Gly; 5 = Ala; 6 = Hser; 7 = Mur; 8 = $GlcNH_2$; 9 = Orn - Ala; X und Y unbekannt. Doppelte Schraffierung: nur im normalen Totalhydrolysat nachweisbar; 7 und 8 im verstärkten Totalhydrolysat nur noch in geringen Mengen vorhanden.

Die Substanz X ergab am Analysator mit unserem Puffersytem einen Peak zwischen Glucosamin und Ornithin. Die Substanz Y konnte am Analysator nicht lokalisiert werden.

Homoserin bildet unter den sauren Bedingungen der Hydrolyse teilweise ein Lacton aus (Perkins 1965). Dieses Lacton (innerer Ester zwischen der Carboxylgruppe und der Hydroxylgruppe) besitzt immernoch eine freie Aminogruppe, ist also noch ninhydrinpositiv. Wir konnten es allerdings auf dem 2-dimensionalen Papierchromatogramm

nicht lokalisieren. Im Analysatorlauf würde es bei den basischen Aminosäuren, in dem bei uns angewendeten Puffersystem nach dem Lysin erscheinen.Nach Perkins kann das Lacton wieder in freies Homoserin überführt werden, indem man es 5min. in 10N Ammoniak kocht. Durch diese Ammoniakbehandlung wird der größte Teil der Muraminsäure in der Zellwand zerstört, sodaß auf diese Weise eine quantitative Bestimmung des Homoserins mit Hilfe des Aminosäureanalysators möglich ist.

Tabelle 10 zeigt die Aminosäurezusammensetzung der Zellwandaufarbeitung A (durchsichtige Kolonien) und B (schleimige Kolonien) nach verschiedenen Hydrolysebedingungen.

1.2 Strukturaufklärung der schwerhydrolysierbaren Verbindungen

1.21 Verbindung Y

Totalhydrolyse der Verbindung in 6N HCl bei 120°C ergab Hydroxyglutaminsäure und Ornithin im Verhältnis 0,8 : 1. Das Peptid wurde dinitrophenyliert und dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel im Laufmittel Propanol/Ammoniak gereinigt. Das gereinigte DNP-Peptid wurde hydrolysiert (4N HCl, 100°C)und auf einer Kieselgeldünnschichtplatte in Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser aufgetrennt. Es ergaben sich 2 gelbe Flecken in Höhe von DNP-Hydroxyglutaminsäure und α-DNP-Ornithin. Der Fleck in Höhe des α-DNP-Ornithins wurde beim Sprühen mit Ninhydrin entsprechend dem authentischen Standard nicht orange wie das δ-DNP-Ornithin, sondern färbte sich erst nach 2 Tagen braun.
Es handelt sich also bei der Verbindung Y um das Peptid N^5-Hydroxyglutamyl - Ornithin.

Tab. 10: Aminosäurezusammensetzung von Zellwandaufarbeitung A und B von Stamm J73 nach den Hydrolysebedingungen 4N HCl, 16Std., 100°C; 6N HCl, 16Std., 120°C; und mit Ammoniakbehandlung.

µMol/mg ZW Molverh.	Mur	Hser	Glu	Hyg	Gly	Ala	$GlcNH_2$	Orn	X
ZW A									
4N HCl, 100°C	+	+	-	0,213	0,303	0,255	0,705	0,261	+
				0,7	1	0,84	2,3	0,86	
4N HCl, 100°C	-	0,063	-	0,141	0,189	0,168	+	0,171	+
+ NH_3		0,33		0,75	1	0,9		0,9	
ZW B									
4N HCl, 100°C	+	+	0,060	0,108	0,198	0,165	0,777	0,189	+
			0,3	0,55	1	0,83	3,9	0,96	
6N HCl, 120°C	-	0,192	0,060	0,120	0,183	0,168	+	0,195	-
+NH_3		1,05	0,33	0,65	1	0,9		1,05	

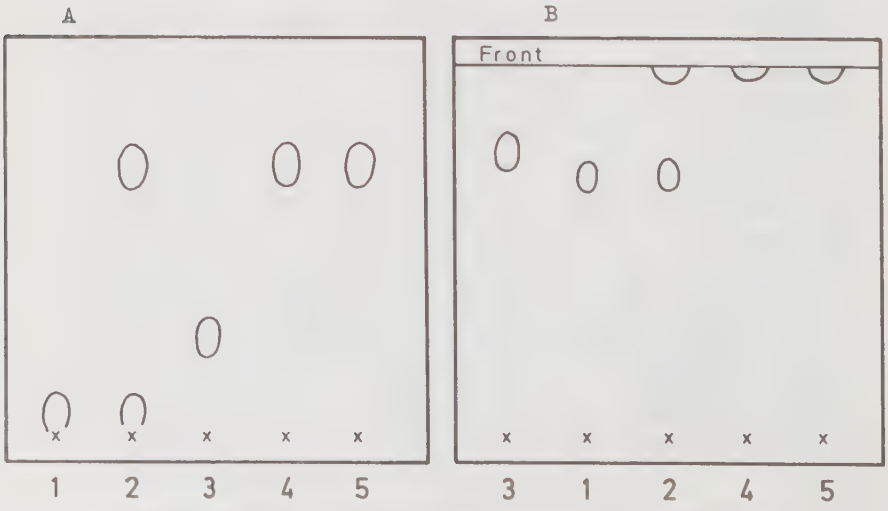
1.22 Verbindung X

a) Die Totalhydrolyse der Verbindung in 6N HCl bei 120°C ergab Homoserin und Glucosamin im Verhältnis 1 : 1,4.

b) Dinitrophenyliertes Peptid

Die Verbindung wurde dinitrophenyliert und aus dem angesäuerten Reaktionsansatz mit Äther extrahiert. Der Extrakt wurde in 4N HCl bei 100°C hydrolysiert und auf Kieselgelplatten in Laufmittel III und V aufgetrennt. Als authentische DNP-Derivate wurden DNP-Glucosamin und DNP-Homoserin aufgetragen, außerdem hydrolysiertes DNP-Homoserin, da sich gezeigt hatte, daß DNP-Homoserin nach einer Totalhydrolyse, möglicherweise wegen Lactonbildung, eine veränderte Laufgeschwindigkeit aufweist (Abb.17).

Abb.17: Schema von Dünnschichtchromatogrammen der hydrolysierten Verbindung DNP-X in Laufmittel III (A) und V (B).



1 = DNP-$GlcNH_2$; 2 = DNP-X hydrolysiert; 3 = DNP-Hser; 4 bzw. 5 = DNP-Hser hydrolysiert bei 100° bzw. bei 120°C.

Es ergaben sich 2 gelbe Flecken, die in beiden Laufmitteln die R_f-Werte von DNP-Glucosamin bzw. hydrolysiertem DNP-Homoserin aufweisen.

c) Bindung des Glucosamins an das Homoserin

Das Sprühen der Verbindung X auf dem Papierchromatogramm mit Anilinhydrogenphtalat ergab keine Farbreaktion. Das deutet darauf hin, daß die reduzierende Gruppe des Glucosamins nicht frei ist.

Reduktion mit Natriumborhydrid:
Zwei Parallelproben der Verbindung X und zwei Parallelproben mit Glucosaminstandard wurden nach der Vorschrift von Leyh-Bouille 1966 mit $NaBH_4$ behandelt und nach der Reaktion in 6N HCl, 16Std. bei 120°C hydrolysiert. Dann wurde jeweils zu eier der Parallelproben authentisches Glucosamin zugegeben, und alle 4 Proben wurden auf dem Aminosäureanalysator untersucht. Das quantitativ mit $NaBH_4$ reduzierte freie Glucosamin ergab einen Peak von Glucosaminitol, der, wie die Parallelprobe zeigte, kurz hinter dem Peak von authentischem Glucosamin lag. Im Hydrolysat der Verbindung X lag neben dem Homoserin unverändertes Glucosamin vor, dessen Peak in der Vergleichsprobe mit dem des authentischen Glucosamins zusammenfiel. Das Molverhältnis von Homoserin zu Glucosamin war 1 : 1,1.
Das Ergebnis der Behandlung mit $NaBH_4$ läßt darauf schließen, daß die C-1 Gruppe des Glucosamins in der Verbindung X nicht frei ist. Wahrscheinlich ist das Glucosamin mit dem C-1 an das Homoserin gebunden, und zwar nicht an die Aminogruppe des Homoserins, da diese dinitrophenylierbar ist. Wie aus den weiteren Untersuchungen an Zellwand und Mureinvorstufen von Stamm J73 hervorgeht, ist das Glucosamin glykosidisch an die Hydroxylgruppe des Homoserrins gebunden.

1.3 Qualitative Bestimmung der Zuckerzusammensetzung in den Zellwandaufarbeitungen A und B

Die Zellwände wurden 2Std. in 2N HCl bei 100°C hydrolysiert und papierchromatographisch in den Laufmitteln Phenol und Butanol/Pyridin 2-dimensional aufgetrennt. Es ergaben sich zwischen den beiden Zellwandchargen keine qualitativen Unterschiede. Beide enthielten neben Muraminsäure und Glucosamin Glucose und Galactose, eine geringe Menge an Mannose und einen nicht genau identifizierbaren Zucker, möglicherweise 6-Desoxythallose. Fiedler konnte durch eine gaschromatographische Untersuchung bestätigen, daß es sich bei dem zweifelhaften Zukker um 6-Desoxythallose handelt (persönliche Mitteilung).

1.4 Quantitative Bestimmung von Glucose in den Zellwandaufarbeitungen A und B

Zellwandaufarbeitung A enthielt 0,014µMol Glucose/mg ZW
Zellwandaufarbeitung B enthielt 0,208µMol Glucose/mg ZW.

1.5 Konfigurationsbestimmung von Ornithin

Die Bestimmung der Konfiguration des Ornithins mit Hilfe der optischen Rotationsdispersion des DNP-Derivats ergab, daß es in der D-Konfiguration vorliegt.

1.6 Bestimmung von amidgebundenem Ammoniak

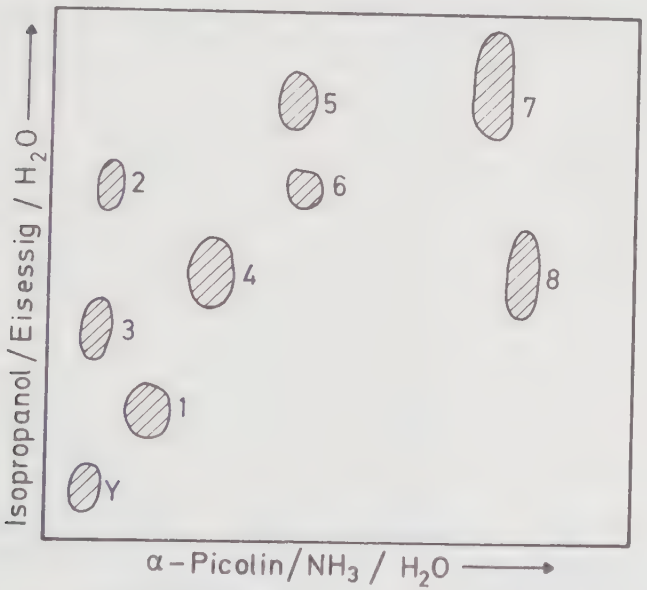
Die 4-Std. Hydrolyse der Zellwandaufarbeitung A lieferte weniger als 0,2 Mol Ammoniak pro Mol Peptiduntereinheit. Daraus ist zu schließen, daß kein Ammoniak in Form eines Amids an das Murein gebunden ist.

1.7 Dinitrophenylierte Zellwand

1.71 Chromatogramm des Totalhydrolysats der DNP-Zellwand

Dinitrophenylierte Zellwand wurde in 4N HCl, 16Std. bei 100°C hydrolysiert und papierchromatographisch 2-dimensional in Laufmittel I und II aufgetrennt (Abb.18).

Abb.18: Schema eines Papierchromatogramms vom Totalhydrolysat der DNP-Zellwand von Stamm J73.



1 = Orn; 2 = Glu; 3 = Hyg; 4 = Gly; 5 = Ala; 6 = Hser; 7 = Mur; 8 = $GlcNH_2$

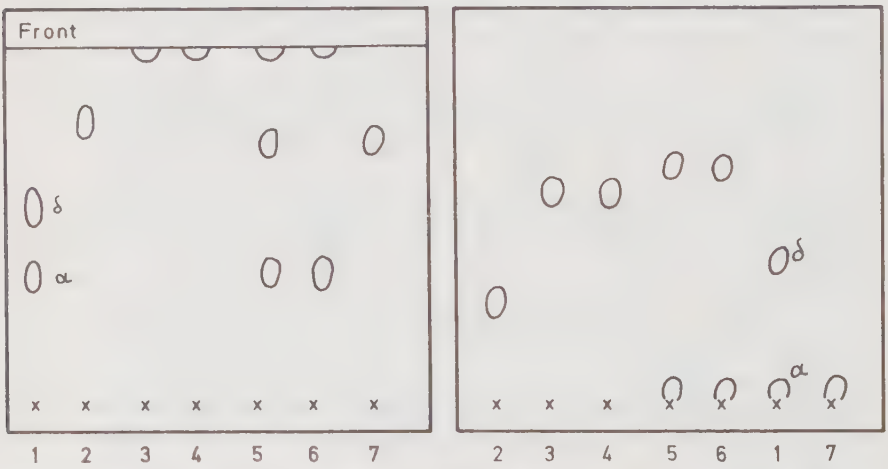
Die in der nicht dinitrophenylierten Zellwand schwer hydrolysierbare Verbindung X ist im Hydrolysat der DNP-Zellwand nicht zu finden. Im übrigen treten in diesem Hydrolysat alle Zellwandaminosäuren und -aminozucker auf.

1.72 Dinitrophenylierte Verbindungen

a) Qualitativ

Die DNP-Zellwand wurde hydrolysiert in 4N HCl bei 100°C und in 6N HCl bei 120°C. Die Hydrolysate wurden auf Kieselgeldünnschichtplatten in Laufmittel III und V aufgetrennt (Abb.19).

Abb.19: Dünnschichtchromatogramme der Hydrolysate (4N HCl,100°C und 6N HCl,120°C) der Zellwand von Stamm J73.



1 = α+δ-DNP-Orn; 2 = DNP-Hser; 3 bzw. 4 = DNP-Hser hydrolysiert bei 100° bzw. bei 120°C; 5 bzw. 6 = DNP-ZW hydrolysiert bei 100° bzw. bei 120°C; 7 = DNP-$GlcNH_2$

Als dinitrophenylierte Verbindungen traten α-DNP-Ornithin und DNP-Glucosamin auf. Der Fleck, der in Benzol/Eisessig etwas schneller als das hydrolysierte DNP-Homoserin gelaufen ist, konnte nicht identifiziert werden. Der gleiche Fleck erschien bei der Auftrennung der hydro-

lysierten DNP-Mureinvorstufe. Jedenfalls handelt es sich dabei um keine DNP-Aminosäure.(siehe 2.33).

b) Quantitativ

Tabelle 11 zeigt die Aminosäure- und Aminozuckerzusammensetzung von nicht dinitrophenylierter Zellwand im Vergleich zu dinitrophenylierter Zellwand beider Zellwandaufarbeitungen.

Dinitrophenylierbares Ornithin:

Bei Zellwandaufarbeitung B ergibt der Vergleich der Hydrolysate von Zellwand (6N HCl, 120°C, $+NH_3$) und DNP-Zellwand (6N HCl, 120°C), in denen das Peptid N^5 - Hyg--Orn gespaltet ist, einen Unterschied an Ornithin von etwa 0,3 - 0,4 Mol/Mol Peptiduntereinheit. Es liegen also 30 - 40% des Ornithins unvernetzt vor. Bei Zellwandaufarbeitung A ist ein Vergleich von dinitrophenylierter und nicht dinitrophenylierter Zellwand zu diesem Zweck nicht möglich, da in den untersuchten Hydrolysaten das schwerhydrolysierbare Peptid N^5 - Hyg - Orn enthalten ist. So wurde das dinitrophenylierte Ornithin isoliert und direkt gemessen:

Der molare Extinktionskoeffizient für α-DNP-Ornithin ist nicht bekannt. Bekannt sind (nach Salton):

bis-DNP-Lysin	$\varepsilon = 2{,}86 \cdot 10^4$
ε-DNP-Lysin	$\varepsilon = 1{,}77 \cdot 10^4$
bis-DNP-Ornithin	$\varepsilon = 2{,}92 \cdot 10^4$

Abschätzung des Extinktionskoeffizienten von δ-DNP-Ornithin:

$$\frac{\varepsilon\ (\text{bis-DNP-Lys})}{\varepsilon\ (\ \varepsilon\text{-DNP-Lys})} = \frac{\varepsilon\ (\text{bis-DNP-Orn})}{\varepsilon\ (\ \delta\text{-DNP-Orn})}$$

ε(δ-DNP-Orn) = $1{,}8 \cdot 10^4$

Dieser Wert wurde als Extinktionskoeffizient für α-DNP-Ornithin benutzt.

Die Messung ergab 0,056µMol α-DNP-Ornithin / mg Zellwand. Bezogen auf Glycin = 0,222µMol/mg = 100% heißt

Tab.11: Aminosäure- und Aminozuckerzusammensetzung von nicht dinitrophenylierter Zellwand im Vergleich zu dinitrophenylierter Zellwand beider Zellwandaufarbeitungen von Stamm J73.

µMol/mg ZW Molverh.		Mur	Hser	Glu	Hyg	Gly	Ala	$GlcNH_2$	Orn	X	Y
ZW A	DNP-ZW 4N HCl,100°C	+	0,225 1	-	0,168 0,76	0,222 1	0,186 0,84	0,328 2,38	0,177 0,8	-	(+)
	ZW 4N HCl,100°C	+	+	-	0,213 0,7	0,303 1	0,255 0,84	0,705 2,3	0,261 0,86	+	(+)
	ZW 4N HCl,100°C + NH_3	-	0,063 0,33	-	0,141 0,75	0,189 1	0,168 0,9	(+)	0,171 0,9	+	(+)
ZW B	DNP-ZW 6N HCl,120°C	(+)	0,189 0,96	0,063 0,3	0,141 0,7	0,198 1	0,165 0,84	0,825 4,15	0,126 0,64	-	(-)
	ZW 4N HCl,100°	+	+	0,060 0,3	0,108 0,55	0,198 1	0,165 0,83	0,777 3,9	0,189 0,96	+	(+)
	ZW 6N HCl,120°C + NH_3	-	0,192 1,05	0,060 0,33	0,120 0,65	0,183 1	0,168 0,9	+	0,195 1,05	-	(-)

das, bei 25% der Peptiduntereinheiten ist das Ornithin nicht quervernetzt. Bei der Kontrolle, der Addition von DNP-Ornithin (o,o56µMol) und nicht dinitrophenyliertem Ornithin (0,177µMol) ergibt sich ein Wert von 0,233µMol/mg Zellwand, das sind 1,05µMol pro µMol Peptiduntereinheit.

Dinitrophenyliertes Glucosamin:
Eine Bestimmung der Menge an DNP-Glucosamin ist durch Vergleich von DNP-Zellwand und nicht dinitrophenylierter Zellwand schwer möglich, da bei normaler Hydrolyse der Zellwand ein Teil des Glucosamins in Form der Verbindung Hser - $GlcNH_2$ gebunden vorliegt. Bei verstärkter Hydrolyse wird ein ziemlich großer Teil des Glucosamins zersetzt, sodaß eine verläßliche Konstante nicht mehr zu ermitteln ist.
Für eine direkte Messung des DNP-Glucosamins fehlt der molare Extinktionskoeffizient. Um selbst eine Eichkurve für die Extinktion von DNP-Glucosamin aufzustellen, wäre authentisches DNP-Glucosamin nötig gewesen, das uns nicht zu Verfügung stand. Die quantitative Dinitrophenylierung von Glucosamin ist wiederum dadurch erschwert, daß im alkalischen Milieu, in dem sie durchgeführt wird, ein Teil des Glucosamins zersetzt wird.
Es wurde versucht, die Menge an dinitrophenyliertem Glucosamin indirekt zu erfahren, indem die Menge der Verbindung Hser - $GlcNH_2$ bestimmt wurde.
Bei normaler Hydrolyse der DNP-Zellwand (4N HCl,16Std. 100°C) tritt die schwer hydrolysierbare Verbindung nicht auf. Das muß bedeuten, daß das Glucosamin bei dinitrophenylierter Aminogruppe leicht vom Homoserin abspaltbar ist, während eine freie Aminogruppe die Bindung stabilisiert, ähnlich, wie die Bindung zwischen Glucosamin und Muraminsäure bei fehlender N-Acetylierung schwerer hydrolysierbar ist (Araki et al. 1971).

Die Differenz an Homoserin in normal hydrolysierter (4N HCl,100°C) Zellwand und hydrolysierter DNP-Zellwand müßte der Menge an Homoserin entsprechen, die in schwer hydrolysierbarer Verbindung vorliegt, das heißt der Menge an Homoserin, an die ein Glucosamin mit freier, dinitrophenylierbarer Aminogruppe gebunden ist. Zellwandaufarbeitung A und die dazugehörige DNP-Zellwand wurden in 4N HCl, 16Std. bei 100°C hydrolysiert und papierchromatographisch 1-dimensional in Laufmittel II aufgetrennt. Die Zone mit Alanin und Homoserin wurde eluiert und auf dem Aminosäureanalysator auf die Zusammensetzung geprüft.
Bei einem Verhältnis von Alanin zu Homoserin in der DNP-Zellwand von 0,84 : 1, ergab sich in der nicht dinitrophenylierten Zellwand ein Verhältnis von 0,84 : 0,4. Das bedeutet, daß etwa 0,6Mol Homoserin pro Mol Peptiduntereinheit mit Glucosamin eine schwer hydrolysierbare Verbindung bilden, das heißt, daß etwa 0,6Mol Glucosamin pro Mol Peptiduntereinheit eine freie Aminogruppe aufweisen.

1.8 Partialchromatogramm und Struktur des Mureins

Abbildung 20 zeigt das Chromatogramm des 45min. Partialhydrolysats der Zellwandaufarbeitung B von Stamm J73 im Vergleich zum 45min. Partialhydrolysat der Zellwand von Corynebacterium poinsettiae.

Die Peptide 10,12, 13, 14,und 15 wurden auf ihre Zusammensetzung untersucht, davon Nr. 12 und 13 näher (siehe 1.2). Die übrigen wurden nach ihrer Lage identifiziert.

Da Aminosäurezusammensetzung und Peptidmuster des Partialhydrolysats von Stamm J73 mit Aminosäurezusammensetzung und Peptiden von Corynebacterium poinsettiae

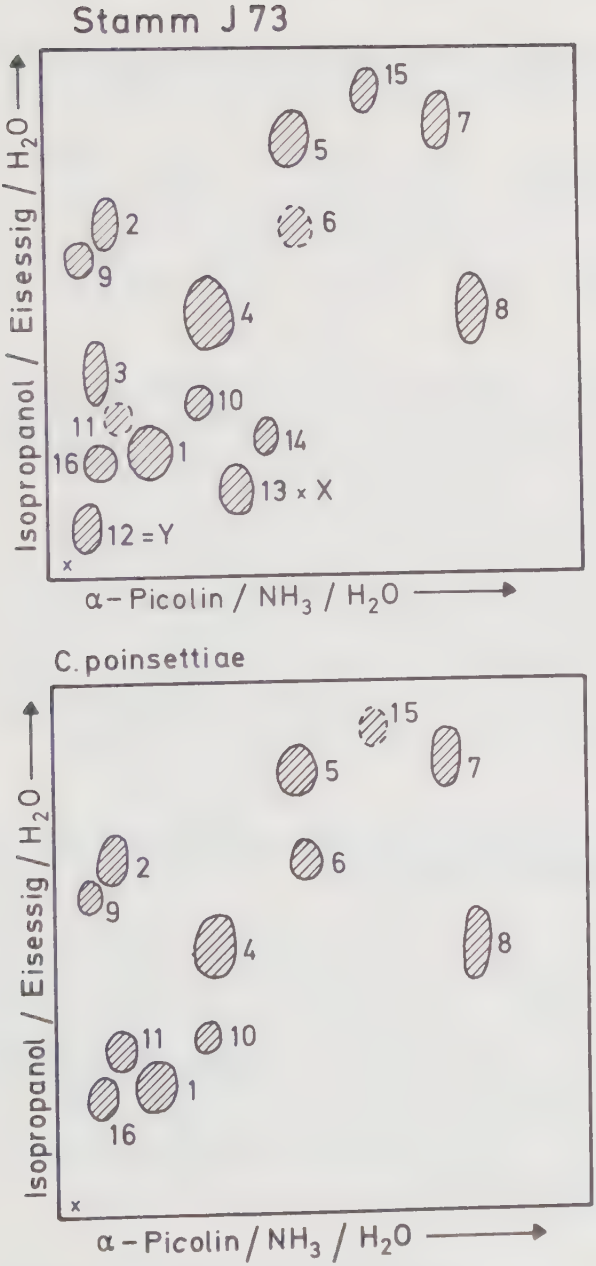


Abb.20: Legende siehe nächste Seite

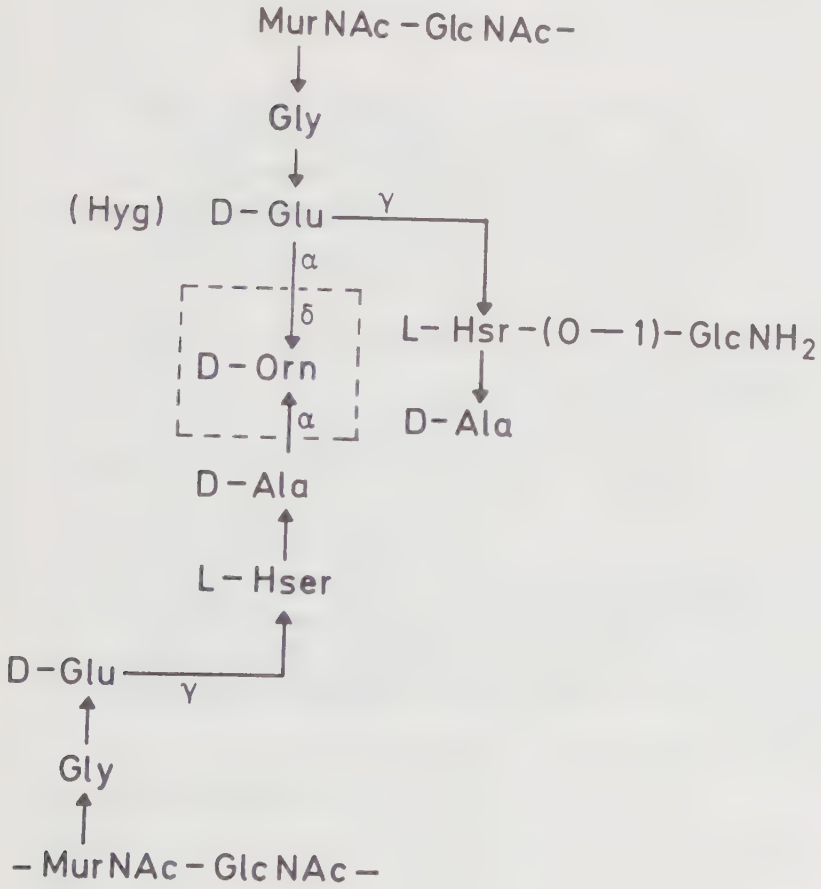
Abb.20: Schema der Chromatogramme der 45min. Partialhydrolysate des Mureins von Stamm J73 und Corynebacterium poinsettiae.
1 = Orn; 2 = Glu; 3 = Hyg; 4 = Gly; 5 = Ala; 6 = Hser; 7 = Mur; 8 = $GlcNH_2$; 9 = Gly - Glu; 10 = Orn - Ala; 11 = N^5-Glu - Orn - Ala? 12 = N^5-Hyg - Orn; 13 = Hser - $GlcNH_2$; 14 = (Hser - $GlcNH_2$) - D-Ala; 15 = Mur - Gly - γ-D-Glu -(Hser - $GlcNH_2$) - D-Ala? 16 = N^5-Glu - Orn?

(Perkins 1967, Fiedler 1971) übereinstimmen, ist zu schließen, daß die Struktur der beiden Mureine die gleiche ist. Die bei Stamm J73 zusätzlich auftretenden Verbindungen N^5-Hyg - Orn (12), Hser - $GlcNH_2$ (13) und (Hser - $GlcNH_2$) - D-Ala (14) weisen auf die Besonderheit des Mureins von Stamm J73 hin, daß nämlich an das Homoserin ein Glucosamin gebunden ist. Und zwar muß es an die Hydroxylgruppe des Homoserins gebunden sein, da die Carboxylgruppe vom C-terminalen D-Alanin besetzt ist. Es kann also für das Murein von Stamm J73 grundsätzlich die in Abbildung 21 gezeigte Struktur vorgeschlagen werden.

1.9 Vorkommen der Verbindung Hser - $GlcNH_2$ im Murein anderer coryneformer Organismen

Zur Untersuchung, ob die Verbindung Hser - $GlcNH_2$ auch in den homoserinhaltigen Mureinen anderer coryneformer Organismen vorkommt, wurden jeweils 2mg Zellwand 1,5 Std. in 4N HCl bei 100°C hydrolysiert und papierchromatographisch 2-dimensional in Laufmittel I und II getrennt. Die Zellwände folgender Arten, die nach Fiedler 1971 und Cziharz 1969 Homoserin enthalten, wurden untersucht:
Corynebacterium poinsettiae
C. flaccumfaciens var. aureus
C. bakeri

Abb.21: Ausschnitt aus der Primärstruktur des Mureins von Arthrobacter Stamm J73



C. CM 13
Coryneformer Organismus NCIB 9568
Arthrobacter trregens
A. laevaniformans
A. flavescens
Brevibacterium saperdae
Br. testaceum
Auf den Chromatogrammen von A. terregens und Br. testaceum war der Fleck Hser - $GlcNH_2$ zu sehen. Br. testaceum weist in der Zellwand die gleiche Aminosäurezusammensetzung auf wie Stamm J73, nur daß die Glutaminsäure nicht hydroxyliert ist. A. terregens hat 2 Mol Glycin im Murein, sonst ist die Zusammensetzung ebenfalls die gleiche wie bei Stamm J73.
In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis steht die Tatsache, daß Keddie 1966 in seiner Tabelle 6 der Zellwandkomponenten einer Reihe von Stämmen, angibt, daß Stamm J73 und A. terregens nur Spuren, beziehungsweise nur wenig der Komponente U besitzen, die sich als Homoserin herausgestellt hat, während die anderen Stämme viel davon aufweisen. Bei den von Keddie angewendeten Hydrolysebedingungen liegt das Homoserin hauptsächlich gebunden mit Glucosamin vor. Keddie führt zwei weitere Stämme auf, die nur wenig Homoserin enthalten, Stamm J34 und Stamm J93, die in dieser Hinsicht noch untersucht werden müßten.

2. Mureinvorstufen

Nachdem im Murein von Stamm J73 gefunden wurde, daß an der Peptiduntereinheit ein Zucker angeheftet ist, wurden die UDP-aktivierten Mureinvorstufen isoliert, um zu klären, ob dieser Zucker bereits an den Mureinvorstufen gebunden ist.

2.1 Isolierung der Vorstufen

Zur Isolierung der Vorstufen wurde eine Kultur von gelblichen, schleimigen Kolonien verwendet. Der Massenkultur wurden keine Antibiotica zur Anreicherung von Nukleotidvorstufen zugegeben.
Der aufgetrennte Extrakt der Zellen ergab nach der Chromatographie im Isobuttersäure Laufmittel neben einigen schwachen Banden eine kurzlaufende, stark UV-absorbierende Bande, die im Äthanol/Ammoniumacetat Laufmittel zur Reinigung rechromatographiert wurde.

2.2 Aminosäurezusammensetzung

Die gereinigte Bande ergab auf dem Chromatogramm nach Sprühen mit Ninhydrin praktisch keine Farbreaktion. Hydrolyse in 5N HCl, 5Std. bei 100°C lieferte folgende Aminosäurezusammensetzung (Tab.13).

Tab.13: Aminosäurezusammensetzung einer UDP-aktivierten Mureinvorstufe von Stamm J73

µMol/ Probe Molverh.	Mur	Hser	Glu	Hyg	Gly	Ala	$GlcNH_2$	X
	+	0,055	0,057	0,007	0,062	0,117	0,053	(+)
		0,9	0,9	0,1	1	1,9	0,9	

Die Konstante für Homoserin wurde aus der Testhydrolyse 4N HCl, 16Std. 100°C +NH_3 berechnet, da für die Chromatographie ein ammoniakhaltiges Laufmittel verwendet wurde.

Ein Teil der Vorstufe wurde in 4N HCl, 16Std. bei 100°C hydrolysiert und papierchromatographisch in Laufmittel I und II aufgetrennt (Abb.22).

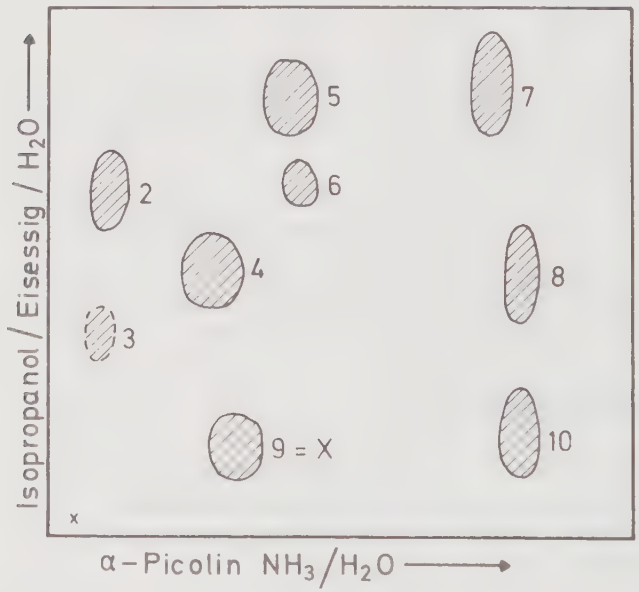


Abb.22: Schema eines Papierchromatogramms vom Totalhydrolysat der UDP-aktivierten Mureinvorstufe von Arthrobacter Stamm J73
2 = Glu; 3 = Hyg; 4 = Gly; 5 = Ala; 6 = Hser; 7 = Mur; 8 = $GlcNH_2$; 9 = X; 10 = nicht bekannt.

2.3 Dinitrophenylierte Vorstufe

Die Mureinvorstufe wurde dinitrophenyliert und in 4N HCl, 16Std. bei 100°C hydrolysiert. Aus dem Hydrolysat wurde

die dinitrophenylierte Komponente im Sauren mit Äther extrahiert.

2.31 Aminosäurezusammensetzung der DNP-Vorstufe

Die im Hydrolysat verbleibenden Aminosäuren wurden am Analysator auf ihre Zusammensetzung untersucht (Tab.14).

Tab.14: Aminosäurezusammensetzung der DNP-Vorstufe von Stamm J73

	Hser	Mur	Glu	Hyg	Gly	Ala	$GlcNH_2$	X
µMol/Probe	+	+	0,497	0,060	0,578	1,125	0,468	(+)
Molverh.			0,86	0,1	1	2	0,8	

Keine der Aminosäuren oder der Aminozucker hat gegenüber der nicht dinitrophenylierten Vorstufe signifikant abgenommen.

2.32 Dünnschichtchromatographie des hydrolysierten DNP-Derivats

Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel in Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser ergab nur einen Fleck, der mit der Front lief. Mit HCl wurde er nicht entfärbt, es handelte sich also nicht um 2,4-Dinitrophenol. Rechromatographie des Flecks in Benzol/Eisessig ergab das in Abbildung 23 gezeigte Chromatogramm.
Bei dem Fleck handelte es sich weder um DNP-Homoserin noch um DNP-Glucosamin. Nach Sprühen mit Ninhydrin zeigte sich keine Farbreaktion. Es lag also auch kein O-DNP-Homoserin vor.

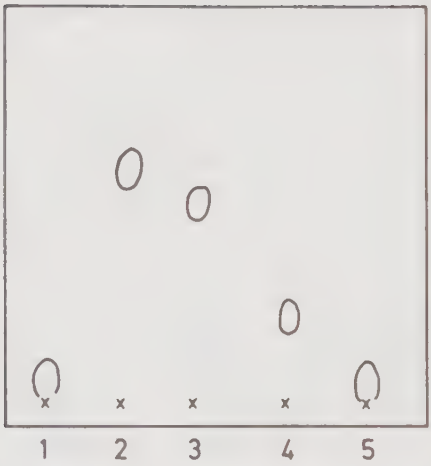


Abb.23: Dünnschichtchromatogramm der hydrolysierten DNP-Vorstufe auf Kieselgel in Benzol/Eisessig
1 = DNP-$GlcNH_2$; 2 = DNP-Vorstufe hydrolysiert; 3 = DNP-Hser hydrolysiert; 4 = DNP-Hser; 5 = DNP-$GlcNH_2$;

2.33 Abspaltung des DNP-Rests mit Hydrazin

Um festzustellen, ob es sich bei dem unbekannten Fleck um eine DNP-Aminosäure handelt, wurde der Dinitrophenylrest mit wasserfreiem Hydrazin abgespaltet. Abbildung 24 zeigt die dünnschichtchromatographische Trennung der mit Hydrazin behandelten Probe und eines gleich behandelten DNP-Homoserinstandards.
Bei der Probe erschien lediglich ein gelber Fleck. Sie hatte also keine DNP-Aminosäure enthalten.
Ein DNP-Aminozucker würde nach der Hydrazinbehandlung ebenfalls ein negatives Ergebnis liefern, da der Aminozucker im stark alkalischen Milieu des Hydrazins sich zersetzen würde. In diesem Fall müßte aber die Vorstufe mit Ninhydrin eine Farbreaktion ergeben.

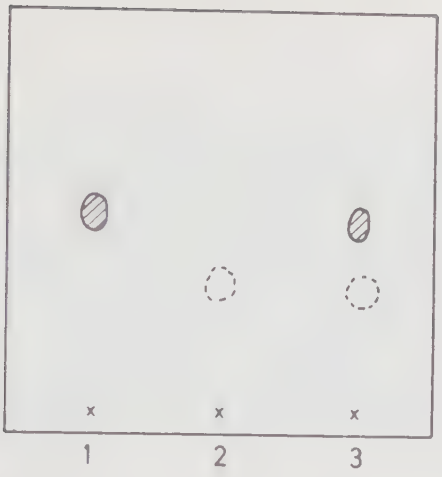


Abb.24: Dünnschichtchromatogramm der hydrazinbehandelten Probe und des hydrazinbehandelten DNP-Homoserinstandards auf Zellulose in Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser, gesprüht mit Ninhydrin.
1 = Hser; 2 = DNP-Vorstufe hydrazinbehandelt; 3 = DNP-Hser hydrazinbehandelt.

8.4 Struktur der Mureinvorstufe

Die vorliegenden Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die in der größten Menge vorkommende UDP-aktivierte Mureinvorstufe von Stamm J73 einen normal aufgebauten Peptidanteil aufweist, nämlich Muramylglycyl - γ - D-Glutamyl - L-Homoseryl - D-Alanyl - D-Alanin. An die Hydroxylgruppe des Homoserins ist wie in der fertigen Zellwand ein Glucosamin gebunden, dessen Aminogruppe jedoch nicht wie in der Zellwand zum größten Teil frei ist, sondern auf irgend eine Weise besetzt , zum Beispiel acetyliert ist.

c) Diskussion

Der Aufbau des Mureins von Stamm J 73 ist der gleiche, wie der bei Corynebacterium poisettiae (Perkins 1967,1971) und einigen anderen coryneformen Organismen (Fiedler 1971). Was das untersuchte Murein von dem von C.poinsettiae unterscheidet und neu unter allen bisher untersuchten Mureinen ist,ist die Bindung von mindestens einem Zucker an die Peptiduntereinheit.Zucker sind zwar kein ungewöhnlicher Bestandteil der Zellwand von gram-positiven Bakterien,aber sie sind im allgemeinen in Form eines Polysaccharids über eine Phosphodiesterbrücke an den Glycanstrang des Mureins angeheftet,nicht an die Peptiduntereinheiten.Im vorliegenden Fall erinnert die Art der Bindung zwischen Glukosamin und Homoserin an die O-glycosidische Bindung zwischen Peptid und Kohlenhydrat bei Glycopeptiden.Sie tritt dort neben der häufigeren N-glycosidischen Bindung auf,bei der der Zucker am reduzierenden Ende mit der Säureamidgruppe eines Asparaginrestes im Peptidanteil reagiert hat.Bei der O-glycosidischen Bindungsart ist der endständige Zucker glycosidisch mit der Hydroxylgruppe einer Hydroxyaminosäure verknüpft. Als beteiligte Aminosäuren wurden bisher L-Serin,L-Threonin,Hydroxy-L-Prolin und Hydroxy-L-Lysin (Montgomery 1970) nachgewiesen,wozu nunmehr Homoserin tritt.

Die Biosynthese der Glycoproteide ist bisher an einigen tierischen Systemen untersucht worden (Montgomery 1970). Man nimmt an,daß zunächst ein nukleotidaktivierter Zucker auf die entsprechende Aminosäure des Proteins übertragen wird,und dann,ausgehend von diesem Zucker das Polysaccharid durch Anhängen weiterer nukleotidaktivierter Zucker aufgebaut wird.Es wäre denkbar,daß auch im vorliegenden Fall für die Übertragung des Glukosamins auf das Homoserin ein nukleotidgebundener Zucker dient,nämlich das UDP-N-Acetylglukosamin,das für die Mureinsynthese benötigt wird.Dafür würde sprechen,daß in der

Vorstufe die Aminogruppe des Glukosamins besetzt vorgefunden wurde.

Es ist mit einiger Sicherheit auszuschließen,daß an der Mureinvorstufe noch eine größere Zahl weiterer Zucker hängt,weil die Vorstufe zusammen mit den normalen Vorstufen von der Sephadexsäule eluiert wurde.Gebunden an mehrere Zucker hätte sie bereits im Ausschlußvolumen der Säule erscheinen müssen.Dort waren aber keine Vorstufen nachzuweisen.Es bleibt zu untersuchen,ob am fertigen Murein noch weitere Zucker gebunden sind,das heißt,ob das Homoserin als Ansatzpunkt für ein größeres Polysaccharid dient.

VI. Zusammenfassung

Es wurden die Mureine und die nukleotidgebundenen Mureinvorstufen von drei coryneformen Bakterien untersucht.

1.Das Murein von Brevibacterium incertum zeigte die gleiche Struktur,die bei dem Murein der Planokokken nachgewiesen wurde,mit L-Lysin als Diaminosäure im Tetrapeptid und D-Glutaminsäure in der Quervernetzung. Bei der Isolierung der nukleotidgebundenen Mureinvorstufen wurde neben dem gewöhnlich vorkommenden UDP-N-Acetylmuramyl-Tripeptid und dem UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid ein UDP-N-Acetylmuramyl-Hexapeptid in signifikanter Menge gefunden.Die Untersuchungen ergaben,daß es sich dabei um ein normal aufgebautes UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid handelt,bei dem die ε-Aminogruppe des Lysins bereits mit dem D-Glutaminsäurerest der Interpeptidbrücke besetzt ist.

2.Beim Murein von Arthrobacter Stamm L39 konnte gezeigt werden,daß die Diaminosäure der Peptiduntereinheit durch L-Glutaminsäure ersetzt ist.Bei der Untersuchung des Mureintotalhydrolysats wurden D-Alanin,L-Lysin,Glycin und D- und L-Glutaminsäure im Verhältnis 1:1:3:1:1 gefunden.Etwa die Hälfte der D-Glutaminsäure war hydroxyliert.Die UDP-aktivierten Mureinvorstufen wurden isoliert und ihr Aufbau untersucht.Es ergab sich die Aminosäuresequenz Glycyl -γ- D-Glutamyl - L-Glutaminsäure für das UDP-N-Acetylmuramyl-Tripeptid und die Sequenz Glycyl -γ- D-Glutamyl - L-Glutamyl - D-Alanyl - D-Alanin für das UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid.Die Untersuchung der Peptide aus dem Zellwandpartialhydrolysat bestätigte die bei den Vorstufen festgestellte Struktur der Peptid-

untereinheit.Die Quervernetzung der Peptiduntereinheiten verläuft über das Peptid Glycylglycyl - L-Lysin.Das N-terminale Glycin ist dabei an die α-Carboxylgruppe der D-Glutaminsäure gebunden,während die ε-Aminogruppe des Lysins die Verbindung zum D-Alanin einer benachbarten Peptiduntereinheit herstellt.

3.Bei der Untersuchung des Mureins von Arthrobacter Stamm J 73 ergab sich die Besonderheit,daß am Homoserin der Peptiduntereinheit ein Glukosaminrest O-glycosidisch gebunden ist.Es konnte gezeigt werden,daß das Glukosamin bereits an die UDP-aktivierte Mureinvorstufe gebunden ist.
Die papierchromatographische Auftrennung des Mureintotalhydrolysats lieferte die Aminosäuren Ornithin, Glutaminsäure,Hydroxyglutaminsäure,Glycin,Alanin und Homoserin und das schwer hydrolysierbare Peptid N^2 - Alanyl - Ornithin.Außerdem traten zwei unbekannte Verbindungen auf.Diese Verbindungen waren nach verstärkter Hydrolyse nicht mehr nachzuweisen.Die Untersuchung dieser beiden schwer hydrolysierbaren Verbindungen zeigte,daß es sich bei der einen um das Peptid N^6 - Hxdroxyglutamylornithin handelt,bei der anderen um ein Homoserin,an dessen Hydroxylgruppe ein Glukosaminrest glycosidisch gebunden ist.Die Analyse der Peptide aus dem Zellwandhydrolysat ließ auf die gleiche Mureinstruktur wie bei Corynebacterium poinsettiae schließen. Die Aminosäuresequenz der Peptiduntereinheit lautete N-Acetylmuramyl - Glycyl -γ- D-Glutamyl - L-Homoseryl- - D-Alanin.Die Quervernetzung der Peptiduntereinheiten ist über ein D-Ornithin hergestellt,das mit der δ-Aminogruppe an die α-Carboxylgruppe der D-Glutaminsäure gebunden ist,und mit der α-Aminogruppe an das D-Alanin einer benachbarten Peptiduntereinheit.Im Unterschied zum Murein von C.poinsettiae ist die Hydroxygruppe des Homoserins von mindestens einem glycosidisch gebundenem Glukosaminrest besetzt.

Literaturverzeichnis

Aminoff,D., Morgan,W.T.J. and Watkins,W.M. (1952), Biochem.J.51, 379
Studies in Immunochemistry.11. The action of dilute alkali on the N-acetylhexosamines and the specific blood-group mucoids.

Araki,Y., Nakatani,T., Makino,R., Hayashi,H. and Ito,E. (1971), Biochem.Biophys.Res.Commun.42,684
Isolation of glucosaminyl- (1-4)muramic acid and phosphoric acid ester of this disaccharide from acid hydrolysates of peptidoglycan of Bacillus cereus AHU 1356 cell walls.

Bergmeyer,H.U. (1962), Verlag Chemie, Weinheim
Methoden der enzymatischen Analyse.

Biochemisches Taschenbuch I (1964), Herausg. H.M.Rauen, Springer Verlag Berlin,Göttingen,Heidelberg

Bogdanovsky,D., Interschick-Niebler,E., Schleifer,K.H., Fiedler,F. und Kandler,O. (1971), Eur.J.Biochem.22,173
γ-Glutamyl - Glutamic Acid, an Interpeptide Bridge in the Murein of some Micrococci and Arthrobacter sp.

Braun,V. and Schroeder,W.A. (1967), Arch.Biochem.Biophys. 118,241
A reinvestigation of the hydrazinolytic procedure for the determination of C-terminal amino acids.

Braun,V. and Wolff,H. (1970), Eur, J. Biochem. 14,387
The Murein-Lipoprotein Linkage in the Cell Wall of E.coli.

Braunitzer,G. (1955), Chem.Ber. 88, 2025,
Bestimmung der Reihenfolge der Aminosäuren am Carboxylende des Tabakmosaikvirus durch Hydrazinspaltung.

Bricas,E., Ghuysen,J.M. and Dézelée,Ph. (1967), Biochemistry 6,2598
The cell wall peptidoglycan of Bacillus megaterium KM. I. Studies on the stereochemistry of α,α'-diaminopimelic acid.

Chatterjee,A.N. and Perkins,H.R. (1966), Biochem.Biophys.Res.Commun. 24, 489
Compounds formed between Nucleotides related to the Biosynthesis of Bacterial Cell Wall and Vancomycin.

Chen,P.S., Toribara,T.Y. and Warner,H. (1956), Analytical Chemistry 28, 1736
Microdetermination of Phosphorus.

Cziharz,B. (1969), Diplomarbeit, TH München
Untersuchungen über die Zellwandzusammensetzung bei Stämmen der Gattung Brevibacterium.

Fiedler,F. (1971), Dissertation, TU München
Aminosäuresequenz der Mureine der coryneformen Bakterien.

Guinand,M., Ghuysen,J.M., Schleifer,K.H. and Kandler,O. (1969), Biochemistry 8, 200
The Peptidoglycan in Walls of Butyribacterium rettgeri.

Hunt,S. (1970),Academic Press, London, New York,
Polysaccharide-Protein Complexes in Invertebrates.

Keddie,R.M., Leask,B.G.S. and Grainger,J.M. (1966), J.Appl.Bact. 29, 17
A Comparison of Coryneform Bacteria from Soil and Herbage: Cell Wall Composition and Nutrition.

Levy,A.L. (1954), Nature 174, 126
A Paperchromatographic Method for the Quantitative Estimation of Amino Acids.

Leyh-Bouille,M., Ghuysen,J.M., Tipper,D.J. and Strominger, J.L. (1966), Biochemistry 5, 3079
Structure of the Cell Wall of Micrococcus lysodeikticus. I. Study of the Structure of the Glycan.

McCluer,R.H., Van Eys,J. and Tonster,O. (1955), Abstracts of the 128th meeting of the American Chemical Society, Division of Biological Chemistry, p.65c.

Mandelstam,P., Loercher,R. and Strominger,J.L. (1962), J.Biol.Chem. 237, 2683
A Uridine Diphosphoacetylmuramyl Hexapeptide from Penicillin-treated Streptococcus faecalis.

Montgomery,R. (1970), in: The Carbohydrates IIB, Pigman and Horton Eds., Academic Press, New York and London
Glycoproteins

Neuhaus,F.C. and Lynch,J.L. (1964), Biochemistry 3, 471
The enzymatic synthesis of D-alanyl-D-alanine. III. On the inhibition of D-alanyl-D-alanine synthetase by the antibiotic D-cycloserine.

Niebler,E., Schleifer,K.H. and Kandler,O. (1969), Biochem.Biophys.Res.Commun. 34, 560
The Amino Acid Sequence of the L-Glutamic Acid Containing Mureins of Micrococcus luteus and Micrococcus freudenreichii.

Niu,C. and Fraenkel-Conrat,H. (1955), J.Am.Chem.Soc.77, 5882
Determination of C-terminal amino acids and peptides by hydrazinolysis.

Partridge,S.M. (1949), Nature 167, 443
Aniline Hydrogen Phtalat as a Spraying Reagent for Chromatography of Sugars.

Perkins,H.R. (1965), Biochem. J. 97, 3c
Homoserine in the Cell Walls of Plant-Pathogenic Corynebacteria.

Perkins,H.R. (1967), Biochem.J. 102, 29c
The Use of Photolysis of Dinitrophenyl-Peptides in Structural Studies on the Cell Wall Mucopeptide of Corynebacterium poinsettiae.

Perkins,H.R. (1971), Biochem.J. 121, 417
Homoserine and Diaminobutyric Acid in the Mucopeptide-Precursor-Nucleotides and Cell Walls of some Plant-Pathogenic Corynebacteria.

Plapp,R. and Strominger,J.L. (1970a), J.Biol.Chem. 245, 3667
Biosynthesis of the Peptidoglycan of Bacterial Cell Walls. XVII. Biosynthesis of Peptidoglycan and of Interpeptide Bridges in Lactobacillus viridescens.

Plapp,R. and Strominger,J.L. (1970b), J.Biol.Chem.245, 3675
Biosynthesis of the Peptidoglycan of Bacterial Cell Walls. XVIII. Purification and Properties of L-Alanyl Transfer Ribonucleic Acid-Uridinediphosphate-N-Acetylmuramyl-Pentapeptide Transferase from Lactobacillus viridescens.

Primosigh,J., Pelzer,H., Maass,D. and Weidel,W. (1961), Biochim.Biophys.Acta 46, 68
Chemical Characterization of Mucopeptide released from E.coli Cell Wall by Enzymatic Action.

Reissig,J.L., Strominger,J.L. and Leloir,L.S. (1955), J.Biol.Chem. 217, 959
A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars.

Reynolds,P.E. (1961), Biochim.Biophys.Acta 52, 403
Studies on the mode of action of vancomycin.

Rosenthal,S. and Sharon,N. (1964), Biochim.Biophys. Acta 83, 378
The use of Sephadex G25 for the isolation of nucleotide sugar derivates from Micrococcus lysodeikticus.

Roze,U. and Strominger,J.L. (1966), Mol.Pharmacol. 2,92
Alanine racemase from Staphylococcus aureus; conformation of its substrates and its inhibitor, D-cycloserine.

Salton,M.R.J. (1961), Biochim.Biophys.Acta 52, 329
Studies of the bacterial cell wall. VII. Reaction of walls with hydrazine and with fluorodinitrobenzene.

Sentendreu,R. and Northcote,D.H. (1968), Biochem.J. 109, 419
The structure of glycopeptide isolated from the yeast cell wall.

Sentendreu,R. and Northcote,D.H. (1969), Carbohydr. Res. 10, 584
The Character of Oligosaccharides Attached to Threonin and Serin in a Mannan Glycopeptide Obtained from the Cell Wall of Yeast.

Schleifer,K.H. (1970a), Arch.Mikrobiol. 71, 271
Die Mureintypen der Gattung Microbacterium.

Schleifer,K.H. (1970b), Zentralbl.Bakteriol.Parasitenk. Infektionskr.Hyg. Abt.1, 212, 443
Die Murein(Peptidoglycan)-typen bei gram-positiven Bakterien.

Schleifer,K.H. und Kandler,O. (1967), Arch.Mikrobiol. 57, 335
Zur chemischen Zusammensetzung der Zellwand der Streptokokken.I. Die Aminosäuresequenz des Mureins von Streptococcus termophilus und Streptococcus faecalis.

Schleifer,K.H. und Kandler,O. (1970),J.Bact.103,387
Amino Acid Sequence of the Murein of Planococcus and other Micrococcae.

Schleifer,K.H.,Plapp,R. und Kandler,O. (1967a)Biochem. Biophys.Res.Commun. 26,492
The Amino Acid Sequence of a Glycine-Containing Cell WallPrecursor of Microbacterium lacticum.

Schleifer,K.H.,Plapp,R. und Kandler,O. (1967b),Biochem. Biophys.Res.Commun. 28,566
Identification of Threo-3-Hydroxyglutamic Acid in the Cell Wall of Microbacterium lacticum.

Schleifer,K.H.,Plapp,R. und Kandler,O. (1968),Biochim. Biophys.Acta 154,573
Die Aminosäuresequenz des Mureins von Microbacterium lacticum.

Schleifer,K.H.,Huss,L. und Kandler,O. (1969),Arch. Mikrobiol. 68,387
Die Beeinflussung der Aminosäuresequenz des serinhaltigen Mureins von Staphylococcus epidermidis Stamm 24 durch die Nährbodenzusammensetzung.

Staudenbauer,W. (1968),Fed.Proc. 27,294
D-Aspartic Acid Incorporation into Interpeptide Bridges in Bacterial Cell Walls.

Strobel,G.A.,Talmadge,K.W. und Albersheim,P. (1972), Biochim.Biophys.Acta 261,365
Observations on the structure of the phytotoxic glycopeptide of Corynebacterium sepedonicum.

Swallow,D.L. und Abraham,E.P. (1968),Biochem.J. 70,364
Formation of ε-(aminosuccinyl)-lysine from ε-aspartyllysine from bacitracin A and from cell walls of lactobacilli.

Trevelyan,W.E.,Procter,D.D. und Harrison,J.S. (1950), Nature 166,444
Detection of sugars on paper chromatograms.

Vorliegende Arbeit wurde am Institut für Allgemeine Botanik der Ludwig - Maximilians - Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. O. Kandler von 1969 bis 1972 angefertigt. Ihre Durchführung wurde unterstützt aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Herrn Prof. Dr. O. Kandler danke ich für die intensive wissenschaftliche Betreuung

Herrn Dr. K.H. Schleifer danke ich für sein Interesse an meiner Arbeit und viele wertvolle Anregungen

Frau L. Hagner danke ich für die Ausführung der Aminosäureanalysen und Herrn Dr. Winkler an der TU München für die Messungen der optischen Rotationsdispersion

Lebenslauf

Ich wurde am 23. 6. 1944 in Saaz/CSSR geboren. Meine Eltern sind der Ingenieur Richard Cziharz und seine Frau Maria, geborene Schröpfer. In München besuchte ich die Volksschule und die Oberrealschule. 1964 legte ich die Reifeprüfung an der St.Anna-Mädchenoberrealschule ab. Vom Wintersemester 1964/65 bis zum Sommersemester 1969 studierte ich an der Technischen Hochschule München in der Fachrichtung Mikrobiologie und schloß mit der Diplomprüfung für Biologen ab.
Die vorliegende Arbeit begann ich im Mai 1969 unter der Anleitung von Professor Dr. O. Kandler am Botanischen Institut der Universität München. Dort war ich von April 1969 bis März 1970 Verwalter der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Angestellten. Vom Sommersemester 1969 bis zum Wintersemester 1971/72 war ich als Hilfsassistent tätig.
Seit 1971 bin ich mit dem Biologen Ewald Komor verheiratet.

Brunhild Komor geb. Cziharz

Brunhild Komor, geb. Cziharz